

Vergleich von anterogradem und retrogradem axonalen Transport
im Riechnerv des Hechts

Klaus Buchner



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0042

Vergleich von anterogradem und retrogradem axonalen Transport
im Riechnerv des Hechts

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Klaus Buchner

Oktober 1986

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. D.G. Weiss
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Neuweiler

Tag der mündlichen Prüfung: 16.3.1987

Inhalt

	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen	IV
Zusammenfassung	1
1. Einleitung	4
1.1 Anterograder axonaler Transport	4
1.2 Retrograder axonaler Transport	5
1.3 Bedeutung des axonalen Transports in Physiologie und Pathologie	6
1.4 Bedeutung des axonalen Transports für die Neuroanatomie	7
1.5 Methoden zur Untersuchung des axonalen Transports	8
1.6 Hypothesen zum Mechanismus des axonalen Transports	9
1.7 Problemstellung und Ziel der Arbeit	10
2. Material und Methoden	17
2.1 Versuchstiere und allgemeine Methoden	17
2.1.1 Versuchstiere	17
2.1.2 Versuchsaufbau	17
2.1.3 Injektion von Substanzen	18
2.1.4 Lokale Applikation von Inhibitoren	19
2.1.5 Präparation der Riechnerven	19
2.2 Methoden zur Untersuchung des Transports niedermolekularer Substanzen	20
2.2.1 Leucin	20
2.2.2 Carboxyfluoreszein	20
2.2.3 Inulin	21
2.3 Methoden zur Untersuchung des Transports von HRP	21
2.3.1 Injektionslösung	21
2.3.2 Enzymatische Bestimmung der HRP-Aktivität	22
2.4 In vivo kovalente Markierung zur Charakterisierung der transportierten Proteine	22
2.4.1 Injektionslösung	22
2.4.2 Transportprofile	23

II

2.4.3	Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese	23
2.4.4	SDS-Gelelektrophorese	23
2.4.5	2D-Gelelektrophorese	25
2.4.6	Fluorographie	25
2.5	Videomikroskopische Beobachtung der Organellenbewegung	25
2.5.1	Präparation feiner Axonbündel	25
2.5.2	AVEC-DIC Mikroskopie	26
2.5.3	Videomikroskopie-Aufbau	28
2.5.4	Analoge Kontrastverstärkung	29
2.5.5	Digitale Bildverarbeitung	30
2.5.6	Auswertung der Videobänder	32
3.	Ergebnisse	34
3.1	Transport von niedermolekularen Substanzen	34
3.1.1	Leucin	34
3.1.2	Carboxyfluoreszein	39
3.1.3	Inulin	40
3.2	Axonaler Transport von HRP	41
3.2.1	Retrograder Transport	41
3.2.2	Anterograder Transport	42
3.2.3	Hemmung des Transports von HRP durch Colchizin	43
3.3	Transport von endogenen Proteinen nach kovalenter Markierung	45
3.3.1	Anterograder Transport	45
3.3.2	Transport nach Injektion in die Nervmitte	45
3.3.3	Retrograder Transport	47
3.4.	Transport von Organellen	55
3.4.1	Art der sich bewegenden Organellen	55
3.4.2	Allgemeine Beobachtungen	57
3.4.3	Geschwindigkeit der Organellenbewegung	61
3.4.4	Hemmstoffe des Organellentransports	63
3.4.5	Feinanalyse der Organellenbewegung	67

III

4.	Diskussion	75
4.1	Transport von niedermolekularen Substanzen	75
4.1.1	Bidirektionaler Transport von Leucin	75
4.1.2	Abgrenzung des aktiven Transports von Diffusion	78
4.1.3	Transport von Carboxyfluoreszein	82
4.1.4.	Physiologische Bedeutung des Transports nieder- molekularer Substanzen	83
4.2	Transport von Meerrettichperoxidase	84
4.2.1	Abgrenzung von Diffusion	84
4.2.2	Retrograder Transport von HRP	85
4.2.3	Anterograder Transport von HRP	86
4.2.4	Transportform	86
4.3	Transport von endogenen Proteinen	87
4.3.1	Methode der in vivo kovalenten Markierung von Proteinen	87
4.3.2	Kovalente Markierung nach Injektion in die Mucosa und in die Nervmitte	88
4.3.3	Retrograder Transport von kovalent markierten, endogenen Proteinen	89
4.4	Transport von Organellen	92
4.4.1	AVEC-DIC Mikroskopie	92
4.4.2	Art und Geschwindigkeit der transportierten Organellen	94
4.4.3	Hemmstoffe der Organellenbewegung	97
4.4.4	Mögliche Transportmechanismen	98
4.4.5	Feinanalyse der Organellenbewegung	100
4.5	Vergleich von anterogradem und retrogradem Transport	102
	Literatur	106
	Danksagung	121
	Lebenslauf	122

Verzeichnis der Abkürzungen

AMP-PNP	Adenylyl-imidodiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AVEC-DIC	Allen Video Enhanced Contrast - Differential Interference Contrast
cP	Centipoise
CF	Carboxyfluoreszein
CFDA	Carboxyfluoreszein-diacetat
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
DIC	Differential Interference Contrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -Aminoethylether)N,N'-Tetraessigsäure
EHNA	erythro-9[3-(2-Hydroxynonyl)]adenin
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IEF	isoelektrische Fokussierung
kD	Kilodalton
LLO	lysosomenähnliches Organell (lysosome-like organelle)
M	molar
MES	2-[N-Morpholino]äthansulfonsäure
MVB	multivesikuläres Organell (multivesicular body)
MW	Molekulargewicht
N.A.	numerische Apertur
NP-40	Nonidet NP-40
³ H-NSP	N-Succinimidyl 2,3 - ³ H Propionat
PAGE	Polyacralamid-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R _m	relative Mobilität
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TriEL	Triethylblei
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
WGA	Weizenkeimagglutinin (wheat germ agglutinin)

Zusammenfassung

Nervenzellen besitzen zur Versorgung ihrer Axone und Synapsen mit Proteinen, Lipiden und vielen anderen Substanzen (z.B. Transmitter) ein effektives Transportsystem. Neben diesem anterograden axonalen Transport findet auch ein in entgegengesetzter Richtung laufender (retrograder) Transport statt, durch den a) verbrauchtes Material zum Zellkörper zurückgeschafft wird, und b) zum Überleben der Zelle und zu ihrer Funktion nötige Signale (z.B. Nervenwachstumsfaktor) von der Peripherie zum Zellkörper gelangen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmals in einem umfassenden Vergleich die Transportdynamik in anterograder und retrograder Richtung an einem Modellsystem zu untersuchen. Als Modellsystem wurde der Riechnerv des Hechts ausgewählt. Er besteht aus einer extrem homogenen Population von sehr dünnen, unmyelinisierten Axonen von rund $0.25\ \mu\text{m}$ Durchmesser, die eine beträchtliche Länge erreichen und keine Verzweigungen aufweisen. Trotz des geringen Durchmessers konnte auch in diesen Axonen ein axonaler Transport sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung nachgewiesen werden. Der axonale Transport wurde dann in diesem Modellsystem für verschiedene Substanzen und Zellbestandteile untersucht und verglichen.

1. Nach Injektion von ^3H -Leucin in die Mitte des Nerven konnte ein bidirektionaler Transport von freiem Leucin nachgewiesen werden. Die Geschwindigkeiten waren für beide Richtungen ähnlich, aber langsamer als der anterograde Transport von freiem Leucin nach Injektion in die Region der Zellkörper. Durch Versuche zur Hemmung des gefundenen Transports von ^3H -Leucin durch Colchizin, durch Versuche mit dem Marker für den Extrazellulärraum Inulin und durch rechnerische Abschätzung der Diffusion konnte Diffusion als Ursache für den beobachteten bidirektionalen Transport ausgeschlossen werden.

2. Meerrettichperoxidase (HRP) wurde als Beispiel für ein exogenes Protein in die Region der Zellkörper (Mucosa olfactoria) und in den Bereich der Synapsen (Bulbus olfactorius) injiziert. Biochemische Bestimmung der HRP-Aktivität entlang der Nerven ergab, daß HRP in zwei

Komponenten transportiert wird. Ein Teil der HRP wird in einem schnellen Vorgipfel mit einer Geschwindigkeit von 25 mm/d transportiert. Die Hauptmasse der HRP wird dagegen mit einer Geschwindigkeit von 7 mm/d transportiert. Die Geschwindigkeiten der beiden Komponenten sind für anterograde und retrograde Richtung gleich. Beide Komponenten des retrograden Transports von HRP werden durch Colchizin gehemmt.

3. Zur Untersuchung des retrograden Transports von endogenen Proteinen wurde die Methode der "in vivo kovalenten Markierung" angewandt. Die markierten, endogenen Proteine wurden mit einer Geschwindigkeit von 27 mm/d retrograd transportiert. Die transportierten Proteine wurden mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Fluorographie charakterisiert. Ihre Molekulargewichte sind relativ klein; die Hauptbanden liegen bei 27.5, 32.5, 47.5 und 55 kDalton. Die retrograd transportierten Proteine wurden mit den in früheren Arbeiten mit anderen Markierungsmethoden charakterisierten anterograd transportierten Proteinen verglichen, da ein anterograde Transport mit der Methode der kovalenten Markierung nicht nachweisbar war.

4. Mit Hilfe der Allen Video Enhanced Contrast - Differential Interference Contrast (AVEC-DIC) Mikroskopie konnte sogar in den extrem dünnen Fasern des Hechtrienervens der bidirektionale Transport von Organellen beobachtet und analysiert werden. Runde, lysosomenähnliche Organellen bewegten sich mit einer mittleren Geschwindigkeit von $1.45 \pm 0.5 \mu\text{m/s}$ in anterograder, und von $1.22 \pm 0.5 \mu\text{m/s}$ in retrograder Richtung. Die Geschwindigkeit länglicher Organellen von 1 - 10 μm Länge, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um Mitochondrien handelte, war für die retrograde Richtung annähernd doppelt so schnell als für die anterograde Richtung (1.15 ± 0.39 bzw. $0.65 \pm 0.28 \mu\text{m/s}$). Die Bewegung der Organellen konnte durch Colchizin, Triethylblei und erythro-9[3-(2-Hydroxynonyl)]adenin (EHNA) gehemmt werden. Die Hemmung betraf in allen Fällen beide Richtungen; nur die Hemmung durch EHNA war reversibel.

Eine computergestützte Analyse der Organellenbewegung ergab, daß hinsichtlich der Feindynamik keine wesentlichen Unterschiede zwischen anterograd und retrograd transportierten Organellen zu erkennen sind.

5. Auf den erzielten Ergebnissen aufbauend wurde versucht, ein Gesamtbild des bidirektionalen axonalen Transports im Riechnerv des Hechts zu erstellen, mit dem die verschiedenen gefundenen Transportgeschwindigkeiten erklärt werden können.

Insgesamt unterstützt die in dieser Arbeit gefundene große Ähnlichkeit zwischen anterogradem und retrogradem Transport für verschiedene Substanzen die Ansicht, daß die Mechanismen des anterograden und des retrograden Transports identisch oder zumindest sehr ähnlich sind.

1. Einleitung

Nervenzellen sind stark spezialisierte Zellen. Ihre Form ist gekennzeichnet durch lange Fortsätze, die Dendriten und Axone. Die Oberfläche und das Volumen eines Axons können mehrere Größenordnungen über denen des Zellkörpers liegen, wie z.B. bei einem Motoneuron, dessen Zellkörper im Durchmesser 30 - 50 μm beträgt, dessen Axon aber eine Länge in der Größenordnung von $10^6 \mu\text{m}$ (1 m) erreichen kann.

Da die Syntheseleistungen des Neurons im wesentlichen auf den Zellkörper beschränkt sind, muß die Versorgung von Axon und Synapse mit den zur Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion nötigen Proteinen, Lipiden und vielen anderen Stoffen (z.B. den Peptidtransmittern) vom Zellkörper aus erfolgen. Dies wird durch ein effektives Transportsystem, den axonalen Transport, gewährleistet. Bezüglich der Effektivität und dem hohen Grad an Ordnung stellt der axonale Transport einen Spezialfall des intrazellulären Transportes dar, der eine allen Zellen zukommende Eigenschaft ist (Rebhun, 1972; Schliwa, 1984). Die spezielle Morphologie der Nervenzelle erlaubt es besonders gut, intrazelluläre Transportvorgänge zu untersuchen, so daß der axonale Transport eines der am häufigsten verwendeten Modellsysteme für Untersuchungen dieser Vorgänge darstellt.

1.1 Anterograder axonaler Transport

Der axonale Transport vom Zellkörper zur Synapse (anterograder Transport) läßt sich grob in 2 Geschwindigkeitsklassen unterteilen. Mit dem langsamen Transport (0.2 - 2 mm/d bei 37°C) werden v.a. lösliche Proteine und Proteine des Cytoskeletts (Aktin, Tubulin, Neurofilament-Proteine) mitgeführt (Übersicht bei Grafstein & Forman, 1980; Weiss, 1982a). Über den langsamen Transport, der nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, ist hinsichtlich seiner Eigenschaften und seines Mechanismus weit weniger bekannt, als über den schnellen Transport.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit ist unter "axonaler Transport" im Allgemeinen nur der schnelle axonale Transport zu verstehen. Seine Geschwindigkeit kann in Säugernerven 400 mm/d erreichen. Mit ihm werden eine Reihe membranumgebener Strukturen einschließlich synaptischer Vesi-

kel und damit auch Membranbestandteile wie Proteine, Glykoproteine und Lipide transportiert (zur Übersicht siehe Grafstein & Forman, 1980; Weiss, 1982a). Tabelle I faßt die charakteristischen Geschwindigkeiten des axonalen Transports von im optischen Nerv transportiertem Material zusammen (nach: Weiss, 1982b; siehe dort die Literaturhinweise). Ob die verschiedenen Geschwindigkeiten jeweils einen gesonderten molekularen Mechanismus repräsentieren (z.B. Tytell et al., 1981), oder ob dem axonalen Transport nur ein Mechanismus zugrunde liegt und die Geschwindigkeitsunterschiede auf verschiedene physikalische Eigenschaften des transportierten Materials zurückzuführen sind, wie z.B. von Weiss & Gross (1982) vorgeschlagen, ist nicht bekannt.

Tabelle I: Geschwindigkeiten des axonalen Transports im optischen System von Säugern

Transportgruppe	Maximalgeschwindigkeit mm/d	transportiertes Material	identifizierte Komponenten	Bestimmungsort
I	240 - 410	Membranöses Material (tubulo-vesikuläre Organellen, lösliches Material)	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	Axon und Nerven- endigung
	20 - 240	Synaptische Vesikel	Protein I (Synaptin I)	Nervenendigung
II	20 - 70	Mitochondrien und möglicher- weise andere membranumhüllte Organellen	F ₁ -ATPase, Fodrin	Axon und Nerven- endigung
III - IV	2 - 20	Axoplasmatische Matrix ("Mikrotrabeculae"), lösliche Proteine	Myosin-ähnliche Proteine M1 u. M2, Aktin, Calmodulin, Clathrin, Enolase, Fodrin Kreatin-Phosphokinase	Axon
V	0.5 - 2	Cytoskelett-Elemente	α- u. β-Tubulin, Fodrin, Neurofilament- Proteine	Axon

1.2 Retrograder axonaler Transport

Neben dem bisher behandelten Transport in anterograder Richtung existiert auch ein von der Synapsenregion zum Zellkörper hin gerichteter Transport. Die Geschwindigkeit dieses retrograden axonalen Transports liegt in derselben Größenordnung wie die des schnellen anterograden Transports (Bisby, 1980). Ob es einen langsamen retrograden Transport gibt, ist umstritten (Fink & Gainer, 1980a; Fink & Gainer, 1980b; Gold et al., 1984).

Auf dem Wege des anterograden Transports angelieferte, radioaktiv markierte Proteine lassen sich nach einer gewissen Zeit im retrograden Transport nachweisen. Untersuchungen zum Zeitverlauf dieser Umkehr ergaben eine grobe Übereinstimmung mit den geschätzten Halbwertszeiten der schnell transportierten Proteine (Droz, 1975). Mengenmäßig unterliegen in Motoneuronen ca. 50% des markierten Proteins dem retrograden Transport (Muñoz-Martínez et al., 1981).

Dem retrograden Transport werden allgemein folgende Funktionen zugeschrieben (Bisby, 1982a): Zum einen wird an der Synapse nicht mehr gebrauchtes oder verbrauchtes Material – darunter Enzyme in zum Teil inaktiver Form (Nagatsu et al., 1976) – zum Zellkörper zurücktransportiert, wo es abgebaut oder für die Wiederverwendung aufbereitet wird. Zum anderen dient der retrograde Transport sehr wahrscheinlich dazu, dem Zellkörper Informationen über den Zustand des Axons, seiner Endigungen oder seiner Umgebung zuzuführen. Dieser Informationstransfer verläuft (primäre sensorische Afferenzen ausgenommen) in der entgegengesetzten Richtung wie die Weiterleitung von Aktionspotentialen (Bisby, 1982a). Diese für die Zellkörper wichtigen Informationen können, wie z.B. der Nervenwachstumsfaktor, Moleküle der Zielzelle sein, die trophische Wirkung auf den Zellkörper haben. Daneben können nach einer Verletzung des Axons Signale (deren chemische Natur noch nicht bekannt ist) zum Zellkörper transportiert werden und dort eine regenerative Antwort auslösen (Bisby, 1984).

1.3 Bedeutung des axonalen Transports in Physiologie und Pathologie

Der bidirektionale axonale Transport spielt eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion der Nervenzelle. Störungen dieses Prozesses haben tiefgreifende Auswirkungen auf die Nervenzelle und finden deshalb ein wachsendes Interesse bei Neurologen, Neurotoxikologen und Neuropathologen (McLean, 1984). Eine Reihe von Krankheiten geht mit Veränderungen des axonalen Transports einher (Diabetes, Morbus Alzheimer, verschiedene Neuropathien, Vergiftungen, verschiedene Lähmungen)(zur Übersicht s. Weiss & Gorio, 1982; Ochs, 1982). Die Frage, ob der axonale Transport dabei eine kausale Rolle spielt, wird derzeit

heftig diskutiert (z.B. Brimijoin et al., 1982; Sjöstrand, 1982; Tomlinson & Mayer, 1984). Von medizinischer Bedeutung ist auch die Tatsache, daß verschiedene Toxine (z.B. Tetanustoxin) und neurotrope Viren (Polio-myelitis, Herpes) über den retrograden axonalen Transport zu ihrem Wirkungsort gelangen (Schwab & Thoenen, 1976; Kristensson, 1982 ;Tomlinson & Esiri, 1983).

1.4 Bedeutung des axonalen Transports für die Neuroanatomie

Der axonale Transport stellt die Grundlage der wichtigsten Methoden zur Untersuchung neuronaler Verbindungen dar (Cowan & Cuénod, 1975; Heimer & Robards, 1981; Mesulam, 1982). So wird die inzwischen klassische Markierungssubstanz, das Enzym Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP, MW 40 000), wenn sie nach Injektion in die Synapsenregion in genügend hoher Konzentration im Extrazellulärraum vorhanden ist, unspezifisch bei der endocytotischen Abschnürung von Membranvesikeln von der Nervenzelle mit aufgenommen ("bulk endocytosis") (LaVail & LaVail, 1974), und anschließend retrograd zum Zellkörper transportiert. Dort kann HRP enzymhistochemisch nachgewiesen werden (LaVail & LaVail, 1974; LaVail, 1978; Mesulam, 1982).

HRP wird auch vom Zellkörper (ebenfalls unspezifisch) aufgenommen und dann in anterograder Richtung transportiert (Broadwell & Brightman, 1979; Turner & Harris, 1974; Mesulam & Mufson, 1980).

Neben HRP werden als retrograde Markierungssubstanzen v.a. Lektine, bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe und Aminosäuren (Sawchenko & Gerfen, 1985; Steward, 1981 ;Cuénod et al., 1982) verwendet. Lektine sind pflanzliche Proteine, die an Zuckerreste von Membranglykoproteinen binden (Nicholson, 1974). So bindet z.B. das Weizenkeimagglutinin (wheat germ agglutinin, WGA) spezifisch an N-Acetyl-Glucosamin-Reste. Nach erfolgter Bindung wird WGA, zusammen mit dem "Rezeptor" im Verlauf der Endocytose internalisiert ("adsorptive endocytosis") (Dumas et al., 1979). Aufgrund der spezifischen Bindung an "Rezeptoren" genügen sehr geringe Mengen an Markierungssubstanz im Extrazellulärraum, um nach einiger Zeit signifikante Mengen an exogenem Material in der Zelle nachweisen zu können, was diese Methoden sehr empfindlich macht (Gonatas et al., 1979; Schwab et al., 1978).

Als anterograde Markierungssubstanzen dienen HRP (s.o.), Lektine und radioaktiv markierte Aminosäuren. Letztere werden nach Aufnahme in die Zellkörper in Proteine eingebaut. Diese werden zu den Nervenendigungen transportiert und können dort mit autoradiographischen Methoden nachgewiesen werden (Edwards & Hendrickson, 1981).

1.5 Methoden zur Untersuchung des axonalen Transports

Die Methoden mit denen der axonale Transport als solcher untersucht wurde und wird, sind im wesentlichen radioaktive Markierungsmethoden und die direkte Beobachtung der Bewegung von sichtbaren Organellen (Grafstein & Forman, 1980; Snyder & Smith, 1984).

Die radioaktiven Markierungsmethoden sind v.a. sehr nützlich zur Untersuchung des anterograden Transportes. Dazu werden radioaktive Vorstufen von Proteinen (Aminosäuren) oder Lipiden (z.B. Glycerol) in den Bereich der Zellkörper appliziert. Nach Aufnahme in die Zelle und Einbau in Proteine bzw. Lipide wird ein Teil des markierten Materials im Axon zur Synapse transportiert. Die Verteilung des radioaktiv markierten Materials entlang des Nerven resultiert in typischen Transportprofilen, die die Bestimmung wichtiger dynamischer Parameter des axonalen Transports wie der maximalen Geschwindigkeit ermöglichen (Gross & Beidler, 1975; Ochs, 1975). Außerdem kann man Aussagen über die Art des transportierten Materials, z.B. die Zusammensetzung der transportierten Proteine, erhalten (zur Übersicht siehe Grafstein & Forman, 1980; Weiss, 1982a).

Auf den retrograden Transport ist diese Methode nicht ohne weiteres anwendbar, da wie schon erwähnt, im Axon und in der Synapse keine Proteinbiosynthese stattfindet. Um den retrograden Transport zu untersuchen, wird oft die Akkumulation von radioaktiv markiertem Material an einer Ligatur beobachtet (Bisby, 1982b; Frizell & Sjöstrand, 1974). Das Anbringen einer Ligatur ist allerdings immer ein starker Eingriff in die Physiologie der Nervenzelle, so daß die Interpretation der so erhaltenen Befunde sehr sorgfältig erfolgen muß (Bisby, 1982b; Snyder & Smith, 1984). Zusätzlich können bei der Bestimmung der Geschwindigkeit des retrograden Transports mit dieser Methode große Unsicherheiten auftreten

(Snyder & Smith, 1984), da z.B. der Umfang der mobilen Fraktion des im Axon vorliegenden Proteins nicht genau bekannt ist (Bisby, 1980).

Die lichtmikroskopische Beobachtung erlaubt es, die intraaxonalen Bewegungen von Organellen direkt zu beobachten. Eine Identifizierung der Organellen ist oft nicht möglich, so daß man sich meist darauf beschränkt, von "Partikeln" zu sprechen (Cooper & Smith, 1974). Die meisten der mit herkömmlichen lichtmikroskopischen Methoden sichtbaren Partikel bewegen sich in retrograder Richtung (Cooper & Smith, 1974; Forman et al., 1977). Erst durch neue Entwicklungen auf dem Gebiet der Videomikroskopie (s.u.) wurde es möglich, auch eine Vielzahl kleiner, in anterograder Richtung transportierter Organellen sichtbar zu machen (Allen et al., 1982; Brady et al., 1982).

Die Objekte, an denen der axonale Transport von Organellen hauptsächlich untersucht wurde, sind Riesenaxone von Invertebraten wie Crustaceen und Tintenfisch und isolierte Einzelfasern des Nervus ischiadicus von Amphibien (zur Übersicht siehe Forman, 1982). Im Unterschied dazu dienen für die oben geschilderten Untersuchungen des anterograden Transportes mit radioaktiven Markierungsversuchen v.a. das optische System von Hühnchen, Goldfisch oder Ratte, der Nervus ischiadicus von Ratte und Frosch, oder auch identifizierte Neurone von Aplysia (zur Übersicht siehe Grafstein & Forman, 1980).

1.6 Hypothesen zum Mechanismus des axonalen Transports

Obwohl der axonale Transport hinsichtlich seiner Eigenschaften gut beschrieben ist (Grafstein & Forman, 1980; Weiss, 1982a; Ochs, 1982), ist sein Mechanismus noch nicht bekannt. Zu seinen grundlegenden Charakteristika gehört seine ATP-Abhängigkeit (Ochs, 1971; Adams, 1982; Weiss, 1986), so daß als krafterzeugende Enzyme ATPasen angenommen werden müssen.

Die bestehenden Hypothesen zum Mechanismus des axonalen Transports lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: Solche, die eine spezifische Interaktion und chemische Bindung zwischen transportiertem Material und den krafterzeugenden Enzymen, analog etwa zur Muskelkontraktion, vorschlagen und solche, die eine unspezifische Kraftübertragung vorschla-

gen. Zur ersten Gruppe gehören "Zahnrad"-Modelle wie die von Schmitt (1968) oder Ochs (1972), sowie "Cytoskelett-Kontraktions"-Modelle, wie sie Porter et al. (1979), oder Ellisman (1982) entworfen haben. Bei den Modellen mit unspezifischer Kraftübertragung soll die Bewegung entweder im endoplasmatischen Reticulum in einer Art Peristaltik (Droz et al., 1975; Rambourg & Droz, 1980) oder aufgrund hydrodynamischer Prozesse in der Nähe von Mikrotubuli erfolgen (Gross, 1975; Weiss & Gross, 1982). Im zuletzt genannten Modell sollen Regionen niedriger Viskosität im Axioplasma durch krafterzeugende Enzyme zum Strömen gebracht werden, wobei diese "Mikroströme" das transportierte Material mit sich führen (Gross, 1975; Weiss & Gross, 1982).

1.7 Problemstellung und Ziel der Arbeit

Sowohl zum anterograden als auch zum retrograden Transport liegen eine Vielzahl von Arbeiten vor. Was bisher noch nicht geleistet wurde, ist ein Vergleich des Transportes für die verschiedenen transportierten Zellbestandteile in anterograder und retrograder Richtung an einem Modellsystem. Ein solcher umfassender Vergleich sollte dazu beitragen, die noch völlig offenen Fragen zu klären, wie ähnlich anterograder und retrograder Transport wirklich sind und ob dem retrograden Transport der gleiche Mechanismus zugrunde liegen kann wie dem anterograden Transport, oder ob es sich um verschiedene Transportsysteme mit verschiedenen Mechanismen handelt.

Das olfaktorische System des Hechts (s. Abb. 1) weist einige Charakteristika auf, die es als sehr gut geeignetes Modellsystem ausweisen, einen solchen Vergleich durchzuführen. Diese Charakteristika sind:

- eine extrem homogene Population von unmyelinisierten Nervenfasern (C-Fasern),
- die beträchtliche Länge der Fasern (je nach Größe des Fisches 25 - 50 mm),
- das Fehlen von Verzweigungen sowohl des Nerven als auch der einzelnen Fasern,
- die klare Trennung der relativ eng umgrenzten Synapsenregion (Bulbus olfactorius) von der Axonregion und der Zellkörperregion.

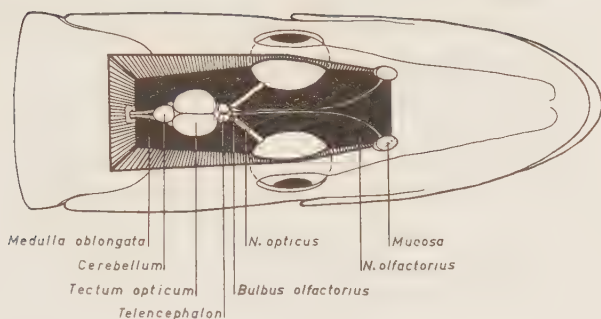


Abb. 1: Schematische Darstellung der Lage von Gehirn und olfaktorischem System im Hechtkopf.

Dadurch ist es auch möglich, daß Substanzen an beiden Enden und in der Mitte des Nerven appliziert werden können, was praktisch bei keinem anderen Nerven ähnlicher Größe durchführbar ist.

Im folgenden soll kurz dargestellt werden, für welche Substanzen und Zellbestandteile der Transport in beide Richtungen charakterisiert und verglichen werden sollte, und zu welchen Fragestellungen im einzelnen damit Beiträge erwartet wurden.

Niedermolekulares Material

Der (anterograde) axonale Transport von Transmittersubstanzen und - nachdem er lange umstritten war (z.B. Csanyi et al., 1973; Neale et al., 1974; Karlsson, 1977) - auch von anderen niedermolekularen Substanzen wie Aminosäuren, Zucker und Aminen ist inzwischen sicher nachgewiesen (Breer & Rahmann, 1974; Ingoglia et al., 1976; Ingoglia et al., 1977; Weiss, 1982c; Schmid, G. et al., 1983). Während die Transmitter in Speicherorganellen verpackt sind und in diesen transportiert werden, ist für die übrigen Substanzen nicht sicher geklärt, ob sie in Vesikeln gespeichert, frei in Lösung, oder an Makromoleküle assoziiert transportiert werden. Der Nachweis, daß niedermolekulares Material auch in frei ge-

löster Form transportiert werden kann, hätte weitreichende Implikationen auf die Modellvorstellungen zum Mechanismus des axonalen Transports und würde stark für hydrodynamische Mechanismen sprechen.

Für Aminosäuren, einige Aminosäure-Transmitter, Noradrenalin und Fluoreszenzfarbstoffe ist auch der Transport in retrograder Richtung nachgewiesen (Cuénod et al., 1982; Schwab & Thoenen 1983). Er bildet auch die Grundlage für wichtige neuroanatomische Methoden (Aschoff et al., 1982; Cuénod et al., 1982; Schmid, H. et al., 1983; Taylor et al., 1983). Von einigen dieser Farbstoffe ist die Lokalisation nach Erreichen des Ziel-Zellkörpers bekannt; so reichern sich z.B. Nuclear Yellow und Bisbenzimid sehr stark im Kernbereich an (Aschoff et al., 1982). Die Lokalisation während des Transports ist jedoch generell weitgehend unklar. Es wird allgemein angenommen, daß diese in der Neuroanatomie verwendeten Farbstoffe in Organellen verpackt sind, da die meisten nach Erreichen des Zellkörpers im Cytoplasma eine granuläre Verteilung zeigen. Es gibt jedoch andere Fluoreszenzfarbstoffe, die nicht in der Neuroanatomie verwendet werden, wie z.B. Carboxyfluoreszein, und Fluoreszein, die frei gelöst im Cytoplasma verbleiben und nicht in intrazelluläre Organellen gelangen (Rotman & Papermaster, 1966; Goodall & Johnson, 1982).

In diesem Teil der Arbeit sollten mehrere Fragen angegangen werden:

- Es sollte festgestellt werden, ob Aminosäuren nach Injektion in die Mitte des Riechnervs in beide Richtungen transportiert werden. Die Geschwindigkeiten sollten für die anterograde und retrograde Richtung verglichen werden und untersucht werden, in welcher Form die Substanzen während des Transports vorliegen. Als Beispiel wurde Leucin gewählt, da der anterograde Transport für diese Aminosäure nach Injektion in den Bereich der Zellkörper nachgewiesen und charakterisiert ist (Schmid, G. et al., 1983).
- Wie oben erwähnt, gibt es Farbstoffe, die nicht in intrazelluläre Organellen gelangen. Diese Farbstoffe durchdringen als nicht fluoreszierende Esterverbindungen (z.B. Fluoreszeindiacetat) nach extrazellulärer Applikation aufgrund ihres lipophilen Charakters die Zellmembran. Im Zellinneren werden sie durch zelleigene Hydrolasen in die hydrophilen, fluoreszierenden Verbindungen (z.B. Fluoreszein)

überführt, die homogen im Cytoplasma verteilt vorliegen (Rotman & Papermaster, 1966; Möncke, 1985).

Am Beispiel Carboxyfluoreszein, das sich hinsichtlich der intrazellulären Verteilung wie Fluoreszein verhält (Rotman & Papermaster, 1966; Wade et al., 1986), sollte untersucht werden, ob auch diese Farbstoffe bidirektional transportiert werden und welche Geschwindigkeiten auftreten.

- Da niedermolekulare Substanzen im Vergleich zu Proteinen und Organellen relativ schnell diffundieren, ist es notwendig, den aktiven Transport von Diffusionsprozessen abzugrenzen. Neben den Versuchen zur Hemmung des Transports von Aminosäuren mit Colchizin, die auch Aufschluß geben sollten über die Geschwindigkeit der Diffusion (intra- und extrazellulär), sollten Versuche zur Diffusion von Inulin, einem Marker für den Extrazellulärraum gemacht werden. Diese sollten es erlauben, die Diffusion auch von anderen Substanzen rechnerisch abzuschätzen.

Meerrettichperoxidase (HRP)

Wie bereits erwähnt, bildet der retrograde Transport von HRP die Grundlage für eine der wichtigsten Methoden in der Neuroanatomie (z.B. Mesulam, 1982). Bei Anwendung von histochemischen Methoden wird die Geschwindigkeit des retrograden Transports von HRP aus der Zeit berechnet, die benötigt wird, bis nach terminaler Applikation eine genügend große, histochemisch nachweisbare Menge an HRP im Perikaryon akkumuliert; die so erhaltenen Geschwindigkeiten stellen Mindestgeschwindigkeiten dar (LaVail & LaVail, 1974).

Im Gegensatz dazu sollte in der vorliegenden Arbeit aus Transportprofilen die maximalen Geschwindigkeiten des axonalen Transports von HRP in anterograder und retrograder Richtung ermittelt und verglichen werden. HRP sollte dabei nicht als neuroanatomische Markierungssubstanz verwendet werden, sondern als Beispiel für ein exogenes Protein dienen, das mit dem axonalen Transport mitgeführt wird. Diese Versuche stellen eine Fortsetzung der Diplomarbeit (Buchner, 1983) dar.

Endogene Proteine

Wie oben bereits angeführt, findet in Axon und Synapse keine Proteinsynthese statt, was zur Folge hat, daß der retrograde Transport endogener Proteine bisher nahezu ausschließlich über den Umweg von Ligaturexperimenten untersucht werden konnte. Eine neue Methode, die von Fink & Gainer (1980a,b) erstmals beschrieben wurde, umgeht das Problem der fehlenden Synthese, indem die Fähigkeit von N-Hydroxysuccinimid-Estern ausgenützt wird, bei physiologischem pH-Wert mit freien α - und ϵ -Aminogruppen von Proteinen zu reagieren. Eine radioaktive kovalente Markierungssubstanz (hier: N-Succinimidyl-³H-Propionat) durchdringt nach Injektion die Zellmembranen und markiert somit extra- und intrazelluläre Proteine, ohne die Physiologie des Neurons oder den Transport der markierten Proteine merklich zu beeinträchtigen. Markierungssubstanz, die nicht an der Reaktion mit Proteinen teilnimmt, wird in dem wäßrigen Milieu der Umgebung der Nervenzelle relativ schnell zu inaktiven Substanzen hydrolysiert (Fink & Gainer, 1980a; Gainer & Fink, 1982).

Günstig für die Anwendung dieser "in vivo covalent labeling"-Technik am Riechnerv des Hechts war, daß die Synapsenregion so eng umgrenzt ist, daß es möglich ist, Transportprofile zu erhalten, aus denen die Geschwindigkeit des retrograden Transports von endogenen Proteinen ermittelt werden kann.

Daneben sollten die retrograd transportierten Proteine mit Hilfe gelelektrophoretischer Methoden charakterisiert und mit den Proteinen, die mit dem anterograden Transport mitgeführt werden, verglichen werden.

Lichtmikroskopische Beobachtung des Transports von Organellen

Der Durchmesser der C-Fasern, aus denen der Riechnerv des Hechts besteht, liegt bei 0.25 μ m (Kreutzberg & Gross, 1977; Seitz-Tutter, 1985) und damit unter dem Auflösungsvermögen der Lichtmikroskopie. Mit speziellen lichtmikroskopischen Techniken in Verbindung mit digitaler Video-Bildverarbeitung (Allen Video Enhanced Contrast - Differential Interference Contrast (AVEC-DIC) Mikroskopie) ist es aber möglich, auch Strukturen, deren Größe unter dem Auflösungsvermögen liegt, sichtbar zu

machen (Allen & Allen, 1983; Allen, 1985). So gelingt es z.B. in günstigen Fällen, einzelne Mikrotubuli (Durchmesser $0.025 \mu\text{m}$) in einer Suspension sichtbar zu machen (Allen & Allen, 1983; Allen, 1985). Bei der verwendeten AVEC-DIC Methode wird von submikroskopischen Objekten ein Beugungsbild erzeugt, in dem der apparente Durchmesser der Mikrotubuli und anderer Strukturen ein Vielfaches ihrer wirklichen Dicke beträgt.

Die AVEC-DIC Mikroskopie wurde bisher zu axonalen Transportstudien v.a. auf Riesenaxone von Tintenfisch (z.B. Allen et al., 1982; Brady et al., 1982; Allen et al., 1985; Vale et al., 1985a,b) und Crustaceen (Forman et al., 1983a,b; Keller et al., 1985; Gulden, 1985) angewendet. Bei myelinisierten Vertebraten-Fasern wirkt die Myelinhülle im AVEC-DIC-Verfahren sehr störend, weil durch sie extreme Helligkeitskontraste und Überstrahlungen entstehen, die die Bildqualität stark beeinträchtigen (s.a. Brady et al., 1985). Daher sind noch kaum Vertebratenaxone mit AVEC-DIC Mikroskopie untersucht worden. Obwohl es aufgrund des geringen Durchmessers der Axone des Hechtrienervs nicht möglich ist, Einzel-fasern zu präparieren und stattdessen die Organellenbewegung in einem feinen Axonbündel beobachtet wird, ist dieses System für eine solche Untersuchung sehr gut geeignet, weil keinerlei störende Myelinhüllen vorhanden sind. Außerdem verlaufen alle Axone parallel und in die gleiche Richtung, d.h. die Richtung einer beobachteten Organellenbewegung ist eindeutig bestimmbar.

Neben der Bestimmung allgemeiner Parameter wie Art, Anzahl, Größe und Geschwindigkeit der Organellen, sollte mit Hilfe eines Computerprogrammes auch eine Analyse der Feindynamik der Organellenbewegung vorgenommen werden.

Zusätzlich zu dem Vergleich der Organellenbewegung in beide Richtungen unter normalen Bedingungen sollte der Einfluß verschiedener Hemmstoffe auf den Transport in beide Richtungen untersucht werden:

- Von dem Mitosegift Colchizin, das die Neubildung von Mikrotubuli aus den Untereinheiten verhindert und auch vorhandenen Mikrotubuli zerstört, ist bekannt, daß es auch den axonalen Transport hemmt (zur Übersicht s. Hanson & Edström, 1978).
- Triethylblei (TriEL) ist das wasserlösliche, hoch cytotoxische Abbauprodukt von Tetraethylblei, das als Antiklopfmittel dem Benzin

zugesetzt wird. Es ist gezeigt worden, daß TriEL in Grünalgen die Bildung der Mitosespindel beeinflußt und die Chromosomenbewegung und die Cytokinese hemmt. Außerdem kann TriEL in vitro und in Zellkulturzellen Mikrotubuli zerstören (Röderer, 1985; Zimmermann et al., 1985).

- Von besonderem Interesse war erythro-9 [3-(2-Hydroxynonyl)] adenin (EHNA), ein ATP-Analogon, das v.a. dyneinartige ATPasen hemmt (Bouchard et al., 1981; Penningroth et al., 1982). In einer Untersuchung des Organellentransports in Hummer-Riesenaxonen war behauptet worden, daß EHNA selektiv den retrograden Transport hemmt (Forman et al., 1983b). Sollte sich dieser Befund bestätigen, könnte daraus auf unterschiedliche Mechanismen für den Transport in die beiden Richtungen geschlossen werden.

Auf den erzielten Ergebnissen aufbauend sollte versucht werden, ein Gesamtbild des axonalen Transports im Riechnerv des Hechts zu entwerfen, das die Dynamik des Transports für beide Richtungen umfaßt.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und allgemeine Methoden

2.1.1 Versuchstiere

Weibliche und männliche Hechte (*Esox lucius* L.) wurden von örtlichen Großhändlern oder von Fischern v.a. aus dem Donaubereich bezogen. Die 35 - 80 cm großen Tiere wurden im Institut in einem Freibecken gehalten, dessen Wassertemperatur zwischen 6 und 16^o C schwankte.

2.1.2 Versuchsaufbau

Das für den Versuch ausgewählte Tier wurde mit einem Kescher gefangen, in ein feuchtes, schwarzes Tuch gewickelt, in den etwa 30 l fassenden Versuchstank aus Plexiglas gebracht, der ca. 15 l Wasser und 25 - 45 ml 5%ige MS-222 Lösung enthielt, und dort auf einem beweglichen Schlitten festgeschnallt. MS-222 (Ethyl-m-Aminobenzoat, Tricaine), ein gebräuchliches Narkosemittel für Fische und Amphibien (Bove, 1966; Bonath, 1977), wird über die Kiemen aufgenommen und führt in wenigen Minuten zur Narkose der Tiere.

Der Tank war mit einem mit ca. 10 l Wasser gefüllten Thermostatbecken verbunden, um eine konstante Versuchstemperatur von $19 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ zu gewährleisten. Das Wasser im Thermostatbecken wurde mit Carbogen angereichert, so daß das Tier durch den Zufluß immer sauerstoffreiches Wasser erhielt.

Durch Beobachtung der Kiemenbewegungen wurde die Atemfrequenz des narkotisierten Hechtes überwacht; sank die Atemfrequenz während des Versuchs zu stark ab, wurde das Wasser im Versuchstank teilweise durch Frischwasser ersetzt, um die Konzentration des Narkosemittels zu verringern.

2.1.3 Injektion von Substanzen

Injektion in Bulbus olfactorius und Nervus olfactorius

Für eine Injektion in den Bulbus oder Nervus olfactorius wurde mit einem Dentalbohrer mit aufgesetztem Sägeblatt die Schädeldecke aufgesägt. Nach Abheben der Knochendecke wurde die darunterliegende Knorpelschicht mit einer gebogenen Skalpellklinge entfernt und der Bulbus und die Nn. olfactorii freigelegt.

Die Injektion erfolgte unter Verwendung von Glaskapillaren und einer Mikro-Druckinjektionsapparatur (Roßberger, 1981). Eine Glaskapillare steht über eine Kapillarhalterung und einen Kunststoffschlauch mit einer Stickstoffflasche in Verbindung. Von einem elektronischen Impulsgenerator (Tektronix Reizgerät Serie 600) wird ein Signal auf ein Magnetventil übertragen, das sich für die Dauer des Impulses öffnet und damit dem Stickstoff den Weg zur Injektionskapillare freigibt. Der Stickstoffdruck wurde am Druckminderer auf 0,5 – 1,5 bar eingestellt. Die Pulsdauer betrug 500 ms.

Die Glaskapillaren von 1 mm Innendurchmesser wurden mit einem Elektroziehgerät gezogen und die Spitze auf einen Durchmesser von ca. 30 µm abgebrochen. Kurz vor der Injektion wurden die Glaskapillaren von hinten mit Hilfe einer Hamiltonspritze mit der Injektionslösung gefüllt. Anschließend wurde mit gefärbtem Immersionsöl überschichtet, um das Absinken des Flüssigkeitspegels in der Kapillare besser verfolgen zu können.

Die Druckimpulse wurden in Abständen über einen größeren Zeitabschnitt verteilt gegeben, bis die gewünschte Flüssigkeitsmenge injiziert war (bei 1 µl auf ca. 20 min verteilt).

Die Kapillare wurde erst 5 – 10 min nach dem letzten Impuls entfernt, um eine Ausbreitung der injizierten Flüssigkeit entlang des Einstichkanals zu vermindern. Die Transportdauer wird ab dem ersten Impuls gerechnet.

Nach der Injektion wurde das Loch über der Injektionsstelle mit 19°C warmem Hechtringer aufgefüllt. Während der Dauer des Transports wurde der Ringer mindestens jede Stunde gewechselt. Die Zusammensetzung des Hechtringers war: 95,8 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,0 mM CaCl₂;

0.6 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 0.8 mM NaH_2PO_4 ; 11 mM NaHCO_3 (Gross & Kreutzberg, 1978).

Injektion in die Mucosa

Eine Stunde vor Injektion einer Substanz in die Mucosa wurden 20 μl 25% Dimethylsulfoxid (DMSO) in das Nasenloch gegeben, um die Permeabilität des Riechepithels zu erhöhen. Die Injektion von 5 μl erfolgte portionsweise mit einer Hamiltonspritze, deren Nadel an mehreren Stellen knapp unter die Oberfläche des Epithels eingestochen wurde. Die Nasenlöcher wurden nach der Injektion mit Parafilm und Gewebekleber "Histoacryl blau" (B.Braun, Melsungen) verschlossen.

2.1.4 Lokale Applikation von Inhibitoren

Bei den Versuchen zur Hemmung des Transportes durch Colchizin wurden Bulbus und Riechnerven so weit wie möglich freigelegt und statt des normalen Hechtringers ein Ringer, der 10 mmol/l Colchizin enthielt, verwendet. Dieser Colchizin-haltige Ringer wurde während der Versuchsdauer mindestens jede Stunde erneuert.

2.1.5 Präparation der Riechnerven

Nach der jeweiligen Transportdauer wurde der Hecht durch eine Überdosis Narkosemittel oder durch Decapitieren getötet und sofort in Eis gepackt, um einen weiteren Transport zu verhindern und die Diffusion einzuschränken. Als Ende der Transportdauer wurde der Zeitpunkt 5 min nach Lagern in Eis angenommen. Während der ganzen Präparation wurden die Nerven wiederholt mit eiskaltem Ringer gespült, der bei den Versuchen zur Charakterisierung der transportierten Proteine 2 mM Phenylmethylsulfonyl Fluorid (PMSF) zur Hemmung der endogenen Proteasen enthielt.

Die Riechnerven umgebender Knorpel wurde entfernt und die Nerven zusammen mit Bulbus und Mucosa auf Eis herauspräpariert, gründlich mit Ringer gespült und je nach Art des Versuchs weiterbehandelt. Die Gesamtdauer der Präparation betrug 20 - 30 min.

2.2 Methoden zur Untersuchung des Transports niedermolekularer Substanzen

2.2.1 Leucin

Injektionslösung

^3H -Leucin (L-4,5- ^3H -Leucin, spez.Akt. 58.5 Ci/mmol, NEN Dreieich) wurde unter Stickstoff auf ca. die zehnfache Konzentration eingeeengt. Von dieser konzentrierten Lösung wurden ca. 0.1 μl , d.h. 1 μCi injiziert.

Bestimmung der Radioaktivität

Nach Versuchsende wurden die Nerven herauspräpariert, eingefroren (-20°C) und in 1 mm Stücke geschnitten.

Die Stücke wurden zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität in 0.5 ml Gewebelöser TS-1 (Zinsser, Frankfurt) aufgelöst, mit 50 μl konzentrierter Essigsäure neutralisiert, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint 501, Zinsser, Frankfurt) versetzt und in einem Szintillationszähler (Nuclear Chicago Mark II, oder Beckmann BETAmatic I) gezählt.

Zur Unterscheidung von TCA-löslicher und TCA-unlöslicher Radioaktivität wurden die 1 mm Stücke 2 mal mehrere Stunden (über Nacht) in je 0.5 ml 10% TCA gewaschen. Die beiden TCA-Überstände wurden jeweils vereinigt, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint 212, Zinsser, Frankfurt) versetzt und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Die fixierten Nervstücke wurden wie oben beschrieben in Gewebelöser aufgelöst und die Radioaktivität gezählt.

2.2.2 Carboxyfluoreszein

Injektionslösung

Da 6-Carboxy-fluorescein-diacetat (CFDA, Calbiochem, Gießen) nicht wasserlöslich ist, wurde ca. 1 μl einer 5%igen Suspension in 2% DMSO injiziert.

Bestimmung der Fluoreszenz

Nach Versuchsende wurden die Nerven in 1 mm Stücke geschnitten und in 300 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ mit Hilfe eines Ultraschallgeräts (Branson Sonifier Cell Disruptor B 15) homogenisiert. Die Homogenate wurden anschließend 5 min bei 10 000 Upm zentrifugiert. Die Carboxyfluoreszein-Fluoreszenz in den Überständen wurde in einer Mikroküvette in einem Spektralfluorometer (Spektralfluorometer SFM 23 B, Kontron, Eching) gegen Wasser gemessen. Die Erregungswellenlänge war $\lambda_{\text{Ex}} = 465 \text{ nm}$, die Emissionswellenlänge war $\lambda_{\text{Em}} = 505 \text{ nm}$.

2.2.3 Inulin

Injektionslösung

Es wurde ca. 1 μl einer gesättigten (d.h. ca. 10%igen) Lösung von radioaktiv markiertem Inulin (Carboxyl- ^{14}C -Inulin, spez.Akt. 2.1 mCi/g, NEN, Dreieich) in Hechtringer (durch Millipore-Filter gefiltert) injiziert.

Bestimmung der Radioaktivität

Zur Bestimmung des radioaktiven Inulins wurden die Nervstücke wie oben für die Aminosäure beschrieben, in Gewebelöser aufgelöst und die Radioaktivität im Szintillationszähler gezählt.

2.3 Methoden zur Untersuchung des Transports von HRP

2.3.1 Injektionslösung

Für die Injektion wurde jeweils eine 10%ige HRP-Lösung (HRP Typ VI, Sigma Chemie, Taufkirchen) in 0.9% NaCl frisch hergestellt und durch ein Millipore-Filter gefiltert. In den Bulbus und in die Mitte des Nerves wurden ca. 0.1 μl , in die Mucosa 5 μl injiziert.

2.3.2 Enzymatische Bestimmung der HRP-Aktivität

Einige Stunden nach Injektion von HRP wurden die Nerven herauspräpariert, gefroren und im Kühlraum in 1 mm lange Stücke geschnitten. Jedes Nervstück und die Bulbi wurden in 150 μ l eiskaltem 0.2 M Tris-HCl Puffer (pH 7.4) in einem Glas-Glas Homogenisator homogenisiert. Die HRP-Aktivität in den Homogenaten wurde mit einem gekoppelten colorimetrischen Test nach Lundqvist und Josefson (1971), modifiziert nach Litchy (1973), bestimmt.

Dazu wurde ein Aliquot des Homogenats zu 90 μ l einer Lösung die 3% (w/v) β -D-Glucose, 0.1 M NH_4Cl und 0.1 M CaCl_2 enthielt, pipettiert und mit H_2O auf ein Volumen von 190 μ l aufgefüllt. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 1 ml einer Lösung aus 70 ml 0.2 M Tris/HCl-Puffer (pH 7.4), 0.7 ml 20% Triton X-100, 0.7 ml 1% O-Dianisidin und 82 μ l Glucose-Oxidase (Typ V aus *Aspergillus niger*, Sigma Chemie, Taufkirchen).

Alle Lösungen wurden mit H_2O bidest hergestellt. Nach 45 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 75 μ l 6 N HCl gestoppt. Die Extinktion wurde in einem Eppendorf Photometer bei einer Wellenlänge von 436 nm gemessen und die HRP-Aktivität anhand einer Eichkurve bestimmt. Daraus wurde die HRP-Menge des gesamten Homogenats berechnet.

Die Eichkurve verläuft bis ca. 7.5 ng HRP linear; die untere Grenze, bis zu der HRP sicher nachweisbar war, lag bei 0.5 ng.

2.4. In vivo kovalente Markierung zur Charakterisierung der transportierten Proteine

2.4.1 Injektionslösung

100 μ l ^3H -NSP-Lösung (N-Succinimidyl 2,3- ^3H Propionat, (114 Ci/mmol; 1 mCi/ml) Amersham Buchler, Braunschweig) wurden unter einem sanften Strom von Stickstoff eingeengt und in 1 μ l Millipore-gefilterter Ringer-Lösung aufgenommen.

2.4.2 Transportprofile

Nach Ende der Transportdauer wurden die Nerven, die Mucosae olf. und die Bulbi olf. herauspräpariert und die Nerven in 1 mm lange Stücke geschnitten.

TCA-lösliche und TCA-unlösliche Radioaktivität wurde wie in 2.2.1 beschrieben im Szintillationszähler bestimmt.

2.4.3. Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese

Nach Ende der Transportdauer wurden die Nerven, die Mucosae olf. und die Bulbi olf. herauspräpariert. Die Nerven wurden in 3 mm lange Stücke geschnitten, mit je 100 μ l MES-Puffer, pH 6.8 (100 mM MES, 0.5 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, 2mM PMSF) versetzt und bis zur Weiterverarbeitung eingefroren ($-20^{\circ}C$). Die Mucosae und die Bulbi wurden in 200 μ l MES-Puffer eingefroren.

Nach Auftauen wurden die Gewebestücke in einem Glas-Glas-Homogenisator homogenisiert; der Homogenisator wurde mit 100 μ l (b.z.w. 200 μ l) MES-Puffer nachgespült und die beiden Volumina vereint. Das Homogenat wurde durch Zugabe eiskalter TCA auf 10% TCA gebracht, 30 min auf Eis inkubiert und 30 min bei 10 000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde 2 mal mit 0.5 ml Ether gewaschen und schließlich in 30 μ l Extraktionslösung (8 M Harnstoff, 1% SDS, 5% Mercaptoethanol) aufgelöst. Ein 5 μ l Aliquot wurde für die Radioaktivitätsmessung abgezweigt.

2.4.4. SDS-Gelelektrophorese

25 oder 10 μ l der mit TCA gefällten und in Extraktionslösung aufgelösten Proteine wurden mit 8 bzw 3.3 μ l 4x konz. Probenpuffer (pH 6.8, 0.25 M Tris/HCl, 40% Glycerin, 20% Mercaptoethanol, 12% SDS, 0.04% Bromphenolblau) versetzt, 3 min bei $95^{\circ}C$ inkubiert, abzentrifugiert (5 min, 10 000 Upm) und auf einem 1.0 oder 1.5 mm dicken 7.5% Polyacrylamidgel (Sammelgel 3%) nach Laemmli (1970) aufgetrennt.

Nach Laufende wurden die Gele 30 min in 0.05% Coomassie Blau R 250 in 35% Isopropanol/10% Essigsäure gefärbt und in 7% Essigsäure differenziert.

Molekulargewichtsbestimmung

Auf mindestens eine Bahn jedes Gels wurde eine Mischung aus Standardproteinen ("high molecular weight standard mixture", Sigma Chemie, Taufkirchen) aufgetragen. Diese Markermischung enthält Myosin (205 kD), β -Galaktosidase (116 kD), Phosphorylase B (97 kD), Rinderserumalbumin (66 kD), Ovalbumin (45 kD) und Carboanhydrase (29 kD). Zusätzlich wurde eine Mischung von radioaktiv markierten (^{14}C) Standardproteinen aufgetragen. Diese enthielt Myosin (200 kD), Globulin (150 kD), Phosphorylase B (97 kD), Albumin (69 kD) und Ovalbumin (46 kD).

Aus den beiden Markersystemen ergaben sich nach Auftragen des Logarithmus des Molekulargewichts gegen den R_m -Wert nahezu identische Eichgeraden für die Molekulargewichtsbestimmung.

Densitometrie

Die Proteinprofile einzelner Bahnen wurden mit einem Densitometer (elscript 400, Hirschmann, Unterhaching) bestimmt.

Radioaktivitätsprofile

Die einzelnen Bahnen der Gele wurden herausgeschnitten und mit einem Gelschneider (Gel slicer, Mickle Inc.) in 1 mm-Scheibchen geschnitten. Diese wurden über Nacht in 8 ml einer Szintillationslösung (42 ml Liquifluor (NEN, Dreieich), 30 ml Protosol (NEN, Dreieich), Toluol ad 1 l) inkubiert und im Szintillationszähler gemessen. Wegen der relativ geringen Radioaktivitätsmengen wurden alle Proben mindestens 20 min gezählt.

2.4.5. 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese wurde nach einem leicht modifizierten System nach O'Farrell (1975) durchgeführt.

Ein Aliquot der in Extraktionslösung gelösten Probe wurde mit einem gleichgroßen Volumen einer Lösung von 8 M Harnstoff, 10% Nonidet P-40 (NP-40) und 10% Ampholine (pH 5-8, LKB, Grärfelfing) versetzt und auf Rundgele ($d = 1$ mm) (3.5% Polyacrylamid, Ampholine pH 5-8)) zur isoelektrischen Fokussierung aufgetragen (12 h 400 V und 1 h 1000 V).

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Rundgele 15 min in Probenpuffer (einfach konzentriert) inkubiert und in der 2. Dimension auf einem SDS Polyacrylamid Gradienten-Gel (5 - 18,5 %) aufgetrennt.

2.4.6. Fluorographie

Die Coomassie-gefärbten Gele (1 und 2D) wurden 30 min in Amplify (Amersham, Braunschweig) inkubiert, in einem Gel Trockner (Model SE 540, Hoefer, San Francisco) auf Filterpapier aufgetrocknet und mit einem Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR 5) bei -70°C entwickelt.

2.5 Videomikroskopische Beobachtung der Organellenbewegung

2.5.1 Präparation feiner Axonbündel

Für die Präparation feiner Axonbündel wurden die Hechte decapitiert und die Nerven wie oben beschrieben (s. 2.1.5) herauspräpariert. Sie wurden in eiskalte, Carbogen-gesättigte Ringer-Lösung überführt und konnten dort vor der Feinpräparation bis zu einigen Stunden aufbewahrt werden.

Einzelne Axone des Hechtriechnerven zu isolieren ist aufgrund ihres extrem geringen Durchmessers unmöglich. So wurde versucht, in Anlehnung an die Methoden zur Präparation von Einzelfasern des N. ischiadicus des

Froschs (Stämpfli, 1946), möglichst feine Axon-Bündel zu präparieren. Dazu wurde ein Nerv auf einen Objektträger gelegt und mit Hilfe einer feinen Injektionsnadel, die als Mikromesser diente, Axonbündel entlang einer Strecke von ca. 10 mm abgeschnitten, so daß schließlich ein feines Bündel mit 0.1 mm oder weniger im Durchmesser übrigblieb. Rund 3 mm proximal und distal des isolierten Bündels wurde der Nerv abgeschnitten, wobei die Nerv-"Stümpfe" als Abstandshalter für das Deckglas dienten.

Während der ganzen Präparation mußte sorgfältig darauf geachtet werden, daß das feine Axonbündel nicht gedehnt wurde. Nur so war sicherzustellen, daß die Struktur erhalten blieb und die Organellenbewegung beobachtet werden konnte.

Das Präparat wurde mit einem dünnen Deckglas (Dicke Nr. 0; 24 x 50 mm) bedeckt und an den langen Seiten mit einer Mischung aus Vaseline, Lanolin und Paraffin (VALAP, 1:1:1, w:w:w) versiegelt. Die kurzen Seiten wurden offen gelassen, um das Perfundieren mit Ringer zu ermöglichen. Zur Perfusion wurde auf eine Seite des Deckglases 10 bis 20 µl frischer Ringer oder Ringer mit Hemmstoffen pipettiert und durch Absaugen von Flüssigkeit an der anderen Seite des Deckglases mit Filterpapierstückchen durchgesaugt. Um einen vollständigen Austausch der Flüssigkeit sicherzustellen, wurden mindestens 3 Aliquots durchgesaugt.

Alle lichtmikroskopischen Beobachtungen erfolgten bei Raumtemperatur (20°C).

2.5.2 AVEC-DIC Mikroskopie

Mit der Allen Video Enhanced Contrast - Differential Interference Contrast (AVEC-DIC) Mikroskopie, die im Vergleich zum menschlichen Auge weit bessere Kontrast-Erzeugung von elektronischen Detektoren (Videokameras) ausnützt, ist es möglich, durch elektronische Steigerung des schwachen Kontrasts vieler biologischer Objekte, Strukturen sichtbar zu machen, die mit konventioneller Lichtmikroskopie bisher nicht erkannt werden konnten (Allen et al., 1981; Allen & Allen, 1983; Allen, 1985). Der visuelle Kontrast C_{visuell} ergibt sich aus:

$$C_{\text{visuell}} = \frac{I_H - I_O}{I_H}$$

wobei I_H die Intensität des Hintergrundes und I_O die Intensität des Objekts ist. Bei Verwendung des Differentiellen Interferenzkontrast (DIC) Verfahrens wird durch Verschiebung eines Wollastonprismas eine Phasenverschiebung ΔB (s. Abb. 2) eingeführt und variiert, und damit I_H und I_O moduliert. Für das Auge wird ein optimaler Kontrast schon bei geringer Phasenverschiebung ($\lambda/30$; Bereich hoher Extinktion) erreicht. Wird die Phasenverschiebung größer, wächst zwar der Zähler $I_H - I_O$, aber die gleichzeitige Zunahme des Nenners I_H reduziert sehr schnell den visuellen Kontrast.

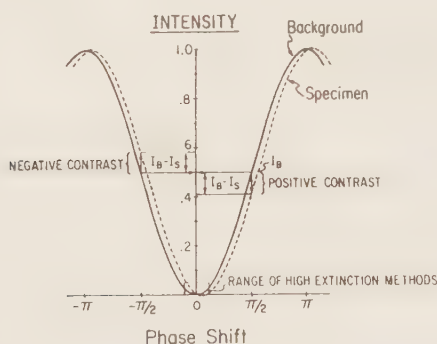


Abb. 2: Abhängigkeit der Lichtintensität von der Phasenverschiebung (ΔB) für den Hintergrund und ein doppelbrechendes Objekt bei der differentiellen Interferenzkontrast-Mikroskopie nach Nomarski. Es ist zu sehen, daß im Bereich hoher Extinktion die Differenz der Intensitäten von Hintergrund und Objekt klein ist. Diese Differenz steigt mit zunehmender Phasenverschiebung an und ist maximal bei $\pi/2$ ($\lambda/4$). (Aus: Allen, 1985)

Durch Verwendung einer regulierbaren Chalnikon-Röhre, wie sie in der verwendeten Kamera eingebaut ist, kann über eine Klemmspannung die Hintergrundhelligkeit im Videosignal verändert werden. Dadurch verändert sich die obige Formel zu:

$$C_{\text{video}} = \frac{I_H - I_O}{I_H - I_V}$$

wobei I_V der durch die Klemmspannung eingeführte Term ist ("offset").

Dies ermöglicht es, in einem Bereich größerer Phasenverschiebung (kleinere Extinktion) zu arbeiten, wo die Differenz $I_H - I_O$ wesentlich größer ist, als im Arbeitsbereich der herkömmlichen DIC-Mikroskopie nach Nomarski (s. Abb. 2) (Aus videotecnischen Gründen ist es noch nicht möglich, bei $\Delta B = \lambda/4$ zu arbeiten; meist wird $\Delta B \approx \pi/4 (\lambda/9)$ verwendet.).

Eine genauere Beschreibung der AVEC-DIC Methode findet sich bei Allen et al., 1981; Allen & Allen, 1983; Allen, 1985; Gulden, 1985.

2.5.3. Videomikroskopie-Aufbau

Zur mikroskopischen Beobachtung der Organellenbewegung wurde ein Polyvar-Mikroskop (Reichert, Wien) benützt, das mit einer Interferenzkontrast-Optik (differentieller Interferenzkontrast nach Nomarski) und einer 200 W Quecksilber-Hochdrucklampe ausgestattet war. Das benützte Objektiv war ein Planapochromat 100x/ N.A. 1.32, Ölimmersion; der Kondensor (N.A. 1.32) war ebenfalls für Ölimmersion ausgelegt.

Wie für die videomikroskopischen Methoden möglich, bzw. erforderlich, wurde immer bei voll geöffneter Aperturblende und unter den Bedingungen für eine Köhler'sche Beleuchtung gearbeitet.

Dem Objektiv war ein Nachvergrößerungsrevolver mit den Stufen 0.8x, 1.0x, 1.25x und 2.0x nachgeschaltet. Die Chalnikon-Videokamera (Hamamatsu, Seefeld) war entweder mit einem 50 mm Objektiv ausgerüstet und vor einem 16x Okular am seitlichen Mikroskoptubus angebracht, oder mit einem Projektiv mit "c-mount" (verschiedene Brennweiten, Leihgabe der Fa. Reichert) fest mit dem Fotoausgang des Mikroskops verbunden.

Die maximale Gesamtvergrößerung, die auf dem Bildschirm erreicht wurde, war ca. 10 000x und wurde für jeden Versuch durch Ausmessen einer mit der jeweiligen optischen Konfiguration auf Video-Kassette aufgenommenen Objektmikrometerplatte genau bestimmt. Meist wurde mit einer ca. 6 500 fachen Vergrößerung (auf dem Bildschirm) gearbeitet.

Das von der Kamera aufgenommene Bild wurde in einem Echtzeit-Bild-verarbeitungssystem (C 1966 Photonic Microscope System, Hamamatsu, Seefeld) verarbeitet (s.u.) und dann parallel auf einem Monitor dargestellt und mit einem Videorekorder (Sony 5800 PS) auf 3/4"-Videobänder (Kodak, KCA 60 "broadcast quality") aufgezeichnet. Über einen zweiten Monitor war es möglich, das unverarbeitete "Rohbild" zu betrachten (s. Abb. 3).

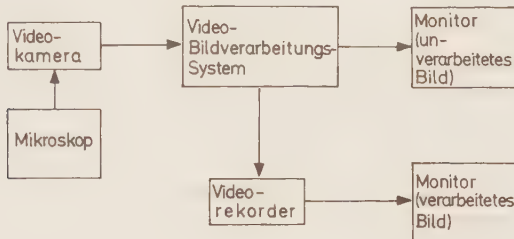


Abb. 3: Blockdiagramm des Videomikroskopie-Aufbaus.

2.5.4 Analoge Kontrastverstärkung

Mit den Funktionen "gain" und "offset" konnte die Chalnikon-Kamera so geregelt werden, daß eine starke Kontrastverstärkung erzielt wurde. Dadurch können Strukturen sichtbar gemacht werden, die sonst nicht erkennbar wären. Mit "offset" wird eine Klemmspannung geregelt, die bewirkt, daß mit zunehmendem "offset" die Hintergrundhelligkeit herabgesetzt wird (s.o.). Anschaulich ausgedrückt, werden dem Bild am "schwarzen" Ende der Grauskala eine Anzahl von Graustufen "weggenommen". Mit "gain" können durch einen Multiplikationsschritt die übriggebliebenen Graustufen nun wieder auf den gesamten zur Verfügung stehenden Bereich gespreizt werden (Abb. 4).

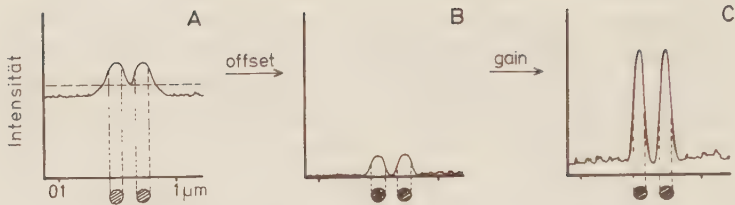


Abb. 4: Analoge Kontrastverstärkung durch die Funktionen "offset" und "gain" der Chalnikon-Videokamera.

Dargestellt sind zwei Partikel von 100 nm Durchmesser und die Intensitätskurven entlang einer durch die Partikel laufenden Zeile des Videobildes. Die Repräsentation der Partikel durch nur eine Zeile des Videobildes dient lediglich der Vereinfachung der Darstellung.

A. Die beiden Partikel-Gipfel der Intensitätskurven sind wegen der hohen Hintergrundhelligkeit für das Auge nicht zu trennen.

B,C. Nach Anwendung von "offset" und "gain" können die Partikel optisch getrennt werden (nach: Gulden, 1985).

2.5.5 Digitale Bildverarbeitung

Das von der Kamera aufgenommene und analog verstärkte Bild wird im Prozessor in ein digitales Bild (672 x 483 pixel x 16 bit) umgewandelt und kann auf vielfältige Art bearbeitet und mit anderen Bildern verrechnet werden. Es wurden in der Hauptsache drei Funktionen angewendet:

- Mit der Funktion "ENHANCE" wurde das Bild zusätzlich zu der oben beschriebenen über die Kamerasteuerung erfolgten analogen Kontrastverstärkung digital kontrastverstärkt. Im wesentlichen leistet diese Funktion auf digitaler Basis das Gleiche wie die "gain" und "offset"-Funktionen der Kamera und wurde fast immer in Verbindung mit den zwei anderen hier beschriebenen Funktionen angewendet.
- Mit Hilfe der Funktion "MOTTLE SUBTRACTION" war es möglich, das Bild durch Subtraktion eines Hintergrundbildes wesentlich zu verbessern. Die Hintergrundstörungen ("mottle"), die durch Linsenfehler, ungleichmäßige Ausleuchtung und Staub in der Optik hervorgerufen werden, werden durch die analoge Kontrastverstärkung unvermeidlich mit ver-

stärkt und wirken sehr störend. Um das "mottle"-Muster zu subtrahieren, wird das Präparat defokussiert, das dann nur noch verbleibende "mottle"-Bild gespeichert und nach erneutem Fokussieren auf die Beobachtungsebene mit Videofrequenz (50 Hz) von jedem neu aufgenommenen Bild subtrahiert.

- Der Großteil der Beobachtungen wurde mit der Funktion "INTERVAL SUBTRACTION" ausgeführt, die die Beobachtung und die Analyse von Organellenbewegungen sehr stark erleichtert. Dabei wird im Gegensatz zur Funktion "MOTTLE SUBTRACTION" von jedem aufgenommenen Bild ein Bild subtrahiert, das gespeichert wurde, während sich das Objekt im Focus befand. Dies resultiert anfangs in einem völlig schwarzen Bild, das durch Zufügen eines digitalen "offset" auf ein mittleres Grauniveau gebracht wird. An Stellen, an denen keine Bewegung auftritt, bleibt das Bild grau, während sich bewegende Objekte selbst heller hervortreten und ihre Startpositionen dunkler markiert werden ("Loch"). Nach einem bestimmten Intervall (z.B. 600 Bilder = 12 sec) wird das gespeicherte und von den darauffolgenden Bildern subtrahierte Bild automatisch erneuert (s. Abb. 5). Dies ist nötig, da durch kleinste Verschiebungen im Präparat bzw. des ganzen Präparats der Hintergrund mit der Zeit unruhig wird.

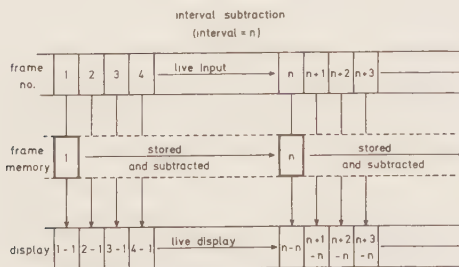


Abb. 5: Schematische Darstellung der Intervall-Subtraktions-Funktion.
(Aus: Buchner et al., 1984).

2.5.6. Auswertung der Videobänder

Fotos vom Bildschirm wurden mit einer Belichtungszeit von $1/4 - 1/2$ sec, um den "Videobalken" (Bildstrich) zu vermeiden auf AgfaPan 100 angefertigt. Es erwies sich als günstig, von einem relativ kleinen Bildschirm (Sanyo, VM 4509) abzufotografieren. Zudem war zwischen Fotokamera und Bildschirm ein Linienfilter (Ronchi-Filter, 50 Linien/inch, Rolyn Optics, Kalifornien) angebracht, um die störenden TV-Linien zu unterdrücken.

Die Geschwindigkeit der Organellen wurde definiert als die Strecke, die ein Organell parallel zur Längsrichtung des Axonbündels durchlief, geteilt durch die Zeit, die es dafür benötigte. Diese Strecke wurde anfangs direkt auf dem Bildschirm gemessen und in μm umgerechnet. Ein großer Teil der Auswertung wurde mit Hilfe des Videomanipulators C 2117 (Hamamatsu, Seefeld) durchgeführt, der nach Eichung eine direkte Messung von Strecken in μm oder auch von Geschwindigkeiten erlaubt. Es wurden immer alle in einer Sequenz beobachteten beweglichen Organellen ausgewertet.

Die Anzahl der sich bewegenden Organellen wurde für eine Reihe von Intervallen der mit "INTERVAL SUBTRACTION" aufgenommenen Videobilder gezählt, mindestens jedoch über einen Zeitraum von 10 min vor, während und nach der Behandlung des Präparats mit Hemmstoff-haltiger Ringer-Lösung.

Zur Feinanalyse der Bewegung wurde ein XY-Tracker, Typ C 1055 (Hamamatsu, Seefeld) verwendet. Dieses Gerät wurde zwischen Recorder und Monitor geschaltet. Es erlaubt für jeweils ein (kontrastreiches) Organell, nach Markierung seiner Position mit einem in das Bild eingeschleiften Rahmen, die automatische Verfolgung des Organells. Die Positions-Koordinaten wurden über eine parallele Schnittstelle an einen Personal Computer (Sirius I, Victor Technologies, Frankfurt) übertragen und auf Diskette gespeichert. Die weitere Verarbeitung erfolgte mit einem von Franz Keller geschriebenen Programm (PARTI-MOVI), das eine ganze Reihe von Möglichkeiten zur Darstellung und Analyse zeitabhängiger Datensätze bietet (für eine genaue Beschreibung siehe Keller, 1986; Weiss et al., 1986).

Die örtliche Auflösung der Methode beträgt 512×512 Pixel. Die zeitliche Auflösung ist prinzipiell nur durch die Video-Frequenz (50 Hz) beschränkt; es erwies sich aber für die meisten Fälle als günstiger, die Partikel-Koordinaten mit einer Frequenz von 25 Hz abzutasten.

3. Ergebnisse

3.1. Transport von niedermolekularen Substanzen

3.1.1 Leucin

Nach Injektion von ^3H -Leucin in die Mitte des Riechnervs wurde nach 0 – 6 Stunden die Radioaktivitätsverteilung entlang des Nervs bestimmt.

Unmittelbar nach Injektion ist die Radioaktivität auf einen sehr schmalen Bereich um die Injektionsstelle beschränkt (s.Abb. 6A). Von diesem an der Injektionsstelle vorhandenen Radioaktivitätspool aus entfernen sich mit zunehmender Überlebenszeit sowohl in anterograde als auch in retrograde Richtung kleine Radioaktivitätsgipfel (s.Abb. 6B).

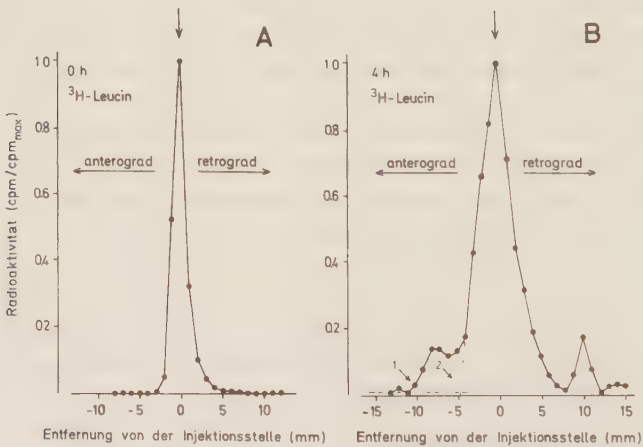


Abb. 6: Anterograde und retrograde Transport nach Injektion von ^3H -Leucin in die Mitte des Riechnervs.

A. Verteilung der Radioaktivität unmittelbar nach Injektion. Die Radioaktivität ist auf einen engen Bereich beschränkt. cpm_{max} : 20400 cpm.

B. Die Radioaktivitätsverteilung 4h nach Injektion zeigt das Auftreten von Transportgipfeln sowohl in anterograde als auch in retrograde Richtung. Die Pfeile zeigen zwei charakteristische Profilpunkte: Die Front des Gipfels (1) und die Front der Hauptmasse (2). Um Profile mit verschiedenen Mengen an injizierter Radioaktivität vergleichen zu können, wurden alle Profile auf den höchsten Wert (Einstichstelle) normiert.

cpm_{max} : 1060 cpm.

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung (Polygram Cel 300; Laufmittel Butanol : Eisessig : $H_2O = 65:15:25$) ergab, daß über 80 % der TCA-löslichen Radioaktivität mit Leucin wandert. Die Menge des im Gipfel transportierten Materials nimmt mit zunehmender Transportdauer ab. Nach Transportzeiten, die über 5 - 6 Stunden lagen, war im allgemeinen kein Gipfel mehr erkennbar. Die Pfeile in Abb. 6B zeigen zwei charakteristische Profilpunkte: Die Front des Gipfels (1), die die maximale Transportstrecke des am schnellsten transportierten Materials widerspiegelt, und die Front der Hauptmasse (2). Aus den aus den einzelnen Versuchen mit verschiedenen Zeiten erzielten Transportprofilen wurden die Werte für die Front der Gipfel und die Front der Hauptmasse ermittelt und gegen die jeweilige Transportdauer aufgetragen (Abb. 7). Die Steigungen der errechneten Regressionsgeraden ergaben die jeweiligen Geschwindigkeiten. Für die Front des Gipfels in anterograder Richtung ergab sich eine maximale Transportgeschwindigkeit von 1.50 ± 0.21 mm/h oder 36 ± 5.1 mm/d. Die maximale Geschwindigkeit in retrograder Richtung betrug 1.92 ± 0.23 mm/h oder 46 ± 5.52 mm/d. Diese Geschwindigkeiten waren statistisch nicht signifikant verschieden ($\alpha = 0.05$; Vergleich zweier Regressionsgeraden nach Storm (1965)).

Für die Ausbreitung des Hauptradioaktivitätspools ergaben sich aus den errechneten Regressionsgeraden Geschwindigkeiten von 6.2 ± 3.1 mm/d in anterograder und 4.1 ± 2.6 mm/d in retrograder Richtung. Die Steigungen beider Geraden waren allerdings aufgrund der relativ großen Streuung der Werte statistisch nicht signifikant von Null verschieden ($\alpha = 0.05$; Prüfung des Regressionskoeffizienten nach Storm (1965)), so daß keine sichere Aussage über die Art der wahrscheinlich vorhandenen Ausbreitung (Diffusion oder aktiver Transport) des Hauptradioaktivitätspools möglich war.

Hemmung durch Colchizin

Um sicherzustellen, daß es sich bei der gefundenen Ausbreitung der Radioaktivität in Gipfeln nach beiden Richtungen um einen aktiven Transport handelt, wurde untersucht, ob sich diese Ausbreitung durch Colchizin hemmen läßt. Dazu wurden 1 h vor Injektion die Nerven mit Ringer-Lösung, die 10 mM Colchizin enthielt, behandelt. Die Radioaktivi-

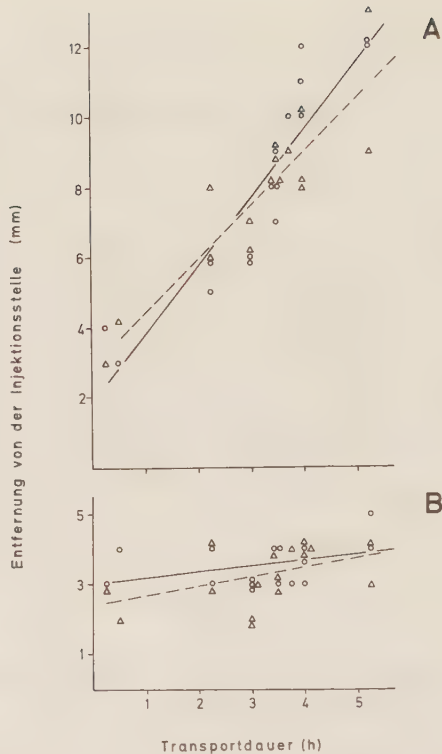


Abb. 7: Anterograder und retrograder Transport von ^3H -Leucin nach Injektion in die Mitte des Riechnerven.

A. Ausbreitung der Front der schnell transportierten Gipfel (v_{max}). Die Steigungen der berechneten Regressionsgeraden für die schnell transportierten Gipfel des anterograden (Dreiecke, gestrichelte Gerade) und retrograden Transports (Kreise, durchgezogene Gerade) ergaben eine Maximalgeschwindigkeit von 36 mm/d für den anterograden und 46 mm/d für den retrograden Transport. Diese Werte sind statistisch nicht signifikant verschieden.

B. Ausbreitung des Hauptradioaktivitätspools von der Injektionsstelle (Hauptfront). Dreiecke und gestrichelte Gerade: anterograde Richtung; Kreise und durchgezogene Gerade: retrograde Richtung. Die Steigungen der beiden Regressionsgeraden sind statistisch nicht von 0 verschieden.

tätsverteilung einige Stunden nach Injektion von ^3H -Leucin wies unter Colchizin-Einwirkung weder in anterograder noch in retrograder Richtung einen Gipfel auf (s. Abb. 8), d.h. die Ausbreitung der Radioaktivität in beiden Richtungen wurde durch Colchizin gehemmt.

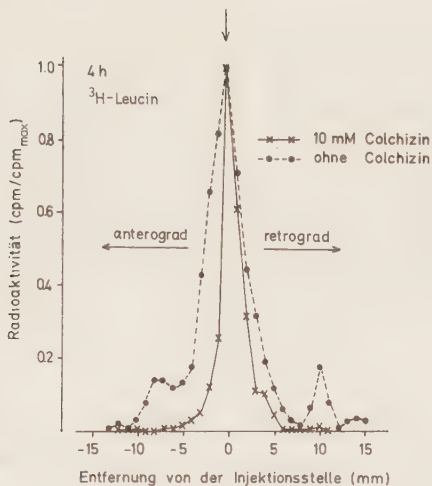


Abb. 8: Hemmung des anterograden und retrograden Transports von ^3H -Leucin durch Colchizin. Die Radioaktivität ist 4 h nach Injektion in Colchizin-behandelte Nerven (—×—×—) auf einen engen Bereich um die Injektionsstelle beschränkt. Zum Vergleich ist die Radioaktivitätsverteilung nach 4 h Transport (—●—●—) (Abb. 6B) eingezeichnet. Die Profile sind auf den höchsten Wert (Einstichstelle) normiert.
 cpm_{max} des Colchizinprofils: 6100 cpm.

Transportform

Um zu untersuchen, in welcher Form ^3H -Leucin nach Injektion in die Mitte des Nerven transportiert wurde, wurden die einzelnen Nervstücke mit 10% TCA behandelt und sowohl die Radioaktivität des TCA-löslichen (freies Leucin) und TCA-unlöslichen Materials (Proteine) bestimmt. Die für verschiedene Transportzeiten erzielten Profile für TCA-lösliche und TCA-unlösliche Radioaktivität zeigen, daß letztere (wahrscheinlich aus nicht-neuronaler Proteinsynthese stammend) auf einen engen Bereich um die Injektionsstelle begrenzt bleibt (s. Abb. 9 A,C), während das TCA-lösliche Material nach beiden Richtungen hin abtransportiert wird (s. Abb. 9 B,D).

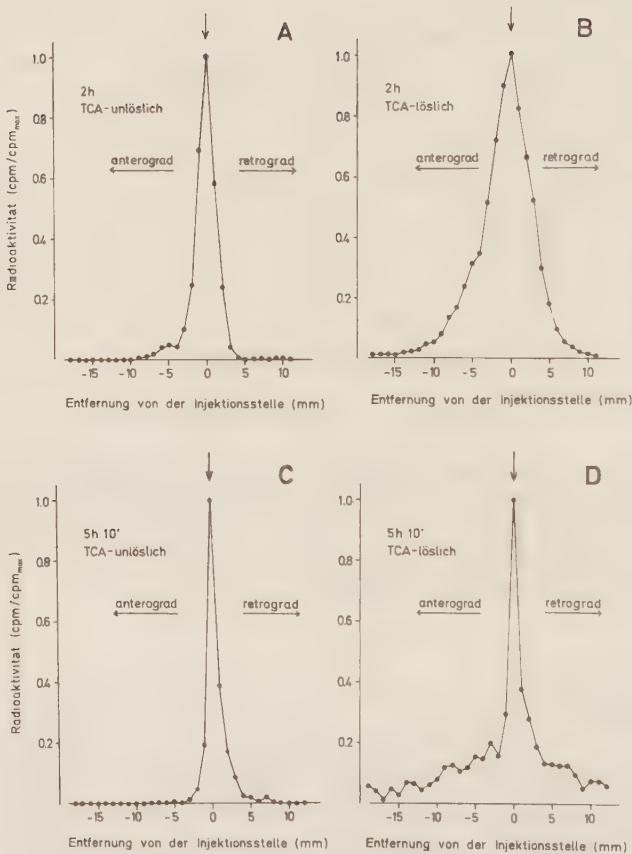


Abb.9: Anterogader und retrograder Transport von ^3H -Leucin nach Injektion in die Mitte des Riechnervens.

In den Nervstücken wurde die TCA-lösliche (B,D) und -unlösliche (A,C) Radioaktivität getrennt bestimmt. Die Proteinradioaktivität bleibt auf einen engen Bereich um die Injektionsstelle beschränkt (A,C), während freies Leucin die Verbreiterung der Flanken und die Bildung der Vorgipfel (B,D) verursacht.

A,B. Normierte Profile für 2h 10 min; A: cpm_{max}: 8520 cpm; B: cpm_{max}: 8190 cpm.
C,D. Normierte Profile für 5h 10 min. C: cpm_{max}: 6850 cpm; D: cpm_{max}: 1040 cpm.

3.1.2 Carboxyfluoreszein

Einige Stunden nach Injektion von CFDA in die Mitte des Riechnervs wurde die Carboxyfluoreszein-Fluoreszenz in den einzelnen Nervstücken bestimmt, die Fluoreszenz der jeweils entsprechenden Stücke des Kontrollnervs abgezogen und die Differenz gegen die Entfernung von der Injektionsstelle aufgetragen. Wie Abb. 10 zeigt, bleibt Carboxyfluoreszein auch einige Stunden nach Injektion auf einen engen Bereich um die Injektionsstelle begrenzt. In keiner der beiden Richtungen ist ein Gipfel erkennbar, der auf einen schnellen Transport schließen lassen könnte.

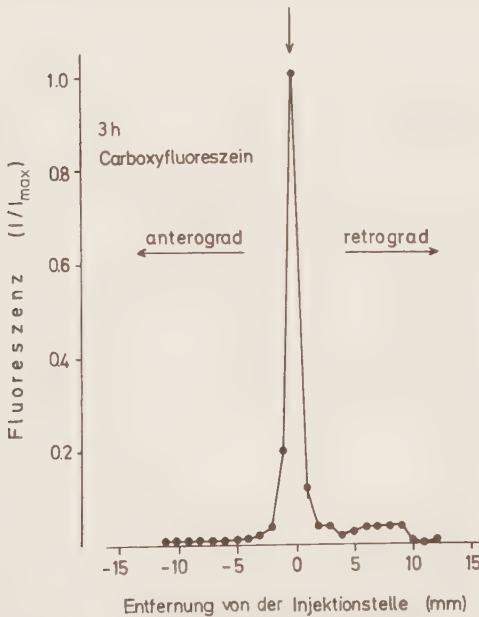


Abb. 10: Ausbreitung von Carboxyfluoreszein (CF) nach Injektion in die Mitte des Riechnervs.

Auch 3 h nach Injektion bleibt die CF-Fluoreszenz auf einen sehr engen Bereich um die Injektionsstelle beschränkt. In keiner der beiden Richtungen ist ein deutlicher Gipfel erkennbar, der auf einen Transport schließen lassen könnte.

3.1.3 Inulin

Einige Stunden nach Injektion von ^{14}C -Inulin, eines Markers für den Extrazellulärraum, in die Mitte des Riechnerven wurde die Radioaktivität in den einzelnen Nervstücken bestimmt und nach Abziehen der Radioaktivität in den entsprechenden Stücken des Kontrollnerven gegen die Entfernung von der Injektionsstelle aufgetragen. Von der Injektionsstelle aus ist nach keiner der beiden Seiten hin ein Radioaktivitätsgipfel erkennbar, der auf einen schnellen Transport schließen lassen könnte. Die Radioaktivität bleibt auf einen engen Bereich um die Injektionsstelle begrenzt (Abb. 11).

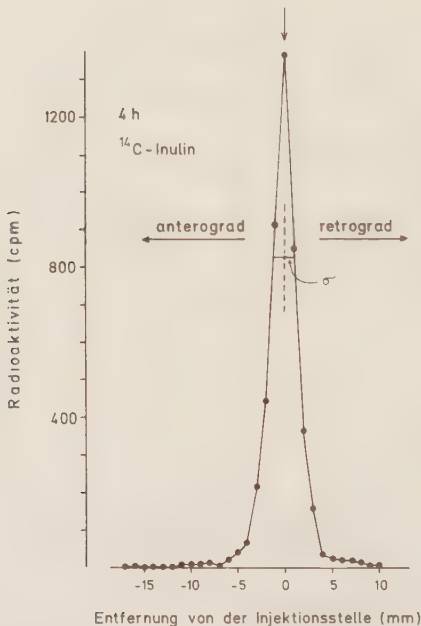


Abb. 11: Verteilung der Radioaktivität entlang des Nerven 4 h nach Injektion von ^{14}C -Inulin.

Die Radioaktivität bleibt auf einen engen Bereich um die Injektionsstelle beschränkt. In keiner der beiden Richtungen treten Transportgipfel auf, die auf einen schnellen Transport schließen lassen könnten.

σ : Halbbreite der Verteilungskurve an der Stelle $H/\sqrt{e}$.

3.2. Axonaler Transport von HRP

3.2.1 Retrograder Transport

Einige Stunden nach Injektion von HRP in den Bulbus olfactorius wies die Verteilung der HRP-Aktivität entlang des Nerven die typische Form eines Transportprofils auf. Es zeigte eine klare Gliederung in Gipfel, Sattelregion und Hauptmasse der transportierten Meerrettichperoxidase (s.Abb. 12 A).

Die Werte für die Front des Gipfels und die Front der Hauptmasse wurden für die aus den einzelnen Versuchen mit verschiedenen Transportzeiten erzielten Profile ermittelt und gegen die jeweilige Transport-

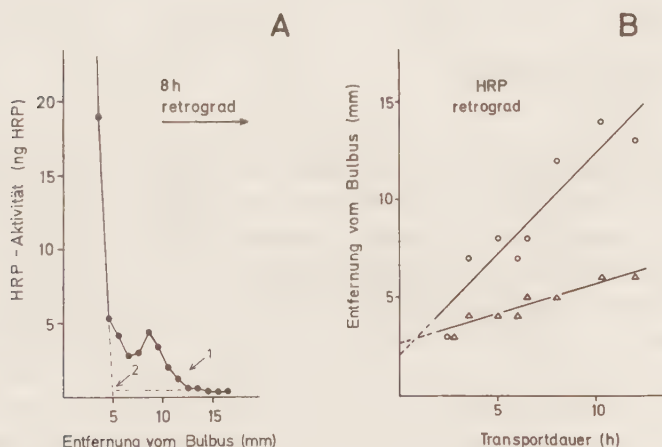


Abb. 12: Retrograder Transport von HRP.

A. Retrograder Transport von HRP 8 h nach Injektion in den Bulbus olfactorius. Für jedes Experiment wurde die enzymatisch bestimmte Menge an HRP in den einzelnen Nervstücken gegen die Entfernung vom Bulbus aufgetragen. Dies ergab typische Transportprofile, mit einer klaren Gliederung in Gipfel, Sattelregion und Hauptmasse der transportierten HRP. Die Pfeile zeigen die Front des Gipfels (1) und die Front der Hauptmasse (2).

B. Abhängigkeit der Entfernungen von Front des Gipfels und Front der Hauptmasse von der Transportdauer. Die Steigungen der berechneten Regressionsgeraden für den Gipfel (Kreise) ergab eine Maximalgeschwindigkeit von 25 mm/d. Die Steigung der berechneten Regressionsgerade für die Hauptfront ergab eine Geschwindigkeit von 7.4 mm/d.

dauer aufgetragen. Wie Abb. 12 B zeigt, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Front des Gipfels und Transportdauer, sowie zwischen Front der Hauptmasse und Transportdauer. Die Korrelationskoeffizienten waren 0.92 bzw. 0.94. Die Steigungen der errechneten Regressionsgeraden ergaben die jeweiligen Geschwindigkeiten. Im Fall der Front des Gipfels erhält man die maximale Geschwindigkeit; sie betrug 1.06 ± 0.18 mm/h oder 25 ± 4.3 mm/d. Für die Front der Hauptmasse ergab sich eine Geschwindigkeit von 0.3 ± 0.04 mm/h oder 7.3 ± 1.0 mm/d.

Die Mengen an HRP, die im Gipfel transportiert wurden, betrugen zwischen 4 und 48 ng, was 0.045 bis 0.35 % der im Bulbus gefundenen Menge entsprach. Die Mengen, die mit der Hauptmasse transportiert wurden, betrugen zwischen 185 und 1500 ng HRP, was 5 bis 30 % der im Bulbus gefundenen Menge entsprach.

3.2.2 Anterograder Transport

Die Auftragung der enzymatisch bestimmten HRP-Aktivität der einzelnen Nervstücke gegen die Entfernung von der Injektionsstelle - hier der Mucosa olf. - ergab wiederum typische Transportprofile (s. Abb. 13A). Front des Gipfels und Front der Hauptmasse wurden bestimmt und wieder gegen die Transportdauer aufgetragen (s. Abb. 13 B). Die Steigungen der berechneten Regressionsgeraden ergaben Geschwindigkeiten von 1.03 ± 0.08 mm/h oder 25 ± 2.11 mm/d und 0.32 ± 0.09 mm/h oder 7.7 ± 2.1 mm/d. Beide Regressionsgeraden waren statistisch nicht signifikant von den entsprechenden Geraden für den retrograden Transport verschieden (Vergleich zweier Regressionsgeraden nach Storm (1965)). Die Steigungen der Regressionsgeraden für die Hauptfront sind beide statistisch von Null verschieden ($\alpha = 0.05$; Prüfung des Regressionskoeffizienten nach Storm (1965)).

Die transportierten Mengen an HRP waren 4.6 bis 29 ng für den Gipfel und 120 bis 1450 ng für die Hauptmasse, und lagen damit in ähnlichen Bereichen wie für den retrograden Transport.

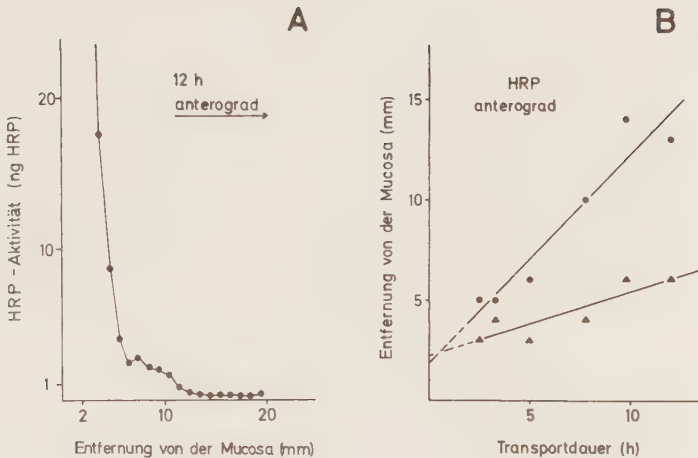


Abb. 13 : Anterograde Transport von HRP.

A. Verteilung der HRP-Aktivität entlang des Riechnervs 2,5 h nach Injektion in die Mucosa. Um Transportprofile zu erhalten, mußte wesentlich mehr HRP als in den Bulbus injiziert werden.

B. Die Steigungen der berechneten Regressionsgeraden für die Front des Gipfels (gefüllte Kreise) ergab eine Maximalgeschwindigkeit von 25 mm/d. Die Steigung der Regressionsgerade für die Hauptfront (gefüllte Dreiecke) ergab eine Geschwindigkeit von 7,7 mm/d. Keine der beiden Geraden ist von der entsprechenden Geraden für den retrograden Transport (Abb. 12) signifikant verschieden.

3.2.3 Hemmung des Transports von HRP durch Colchizin

Wurde Colchizin lokal appliziert, so wurde der retrograde Transport von HRP gehemmt. Die Verteilung der HRP-Aktivität entlang des Nerven einige Stunden nach Injektion von HRP in den Bulbus olf. läßt erkennen, daß kein Gipfel vorhanden ist und daß auch die Bewegung der Hauptmasse an HRP gehemmt ist, wenn man die HRP-Verteilung nach Colchizinbehandlung mit der aus einem Kontrollversuch erhaltenen Verteilung vergleicht (s. Abb. 14).

Ob Colchizin auch den anterograden Transport von HRP hemmt, konnte nicht untersucht werden, da es nicht möglich war, den mucosanahen Bereich der Riechnerven soweit freizulegen, daß eine lokale Applikation von Colchizin möglich gewesen wäre.

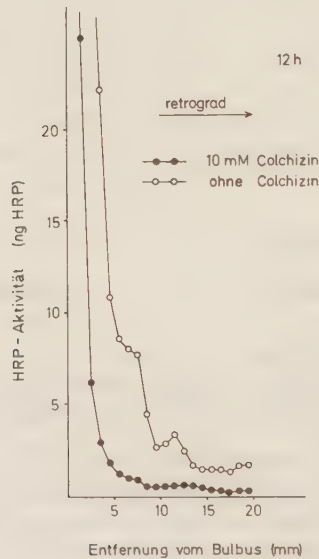


Abb. 14: Hemmung des retrograden Transports von HRP durch Colchizin.

Die Verteilung der enzymatisch bestimmten Mengen an HRP entlang der Nerven 12 h nach Injektion in den Bulbus weist keinen Transportgipfel auf, wenn Bulbus und Riechnerven 1 h vor Injektion mit 10 mM Colchizin in Ringer gespült wurden. Die Ausbreitung der Hauptfront ist ebenfalls gehemmt.

3.3. Transport von endogenen Proteinen nach kovalenter Markierung

3.3.1 Anterograde Transport

Obwohl einige Stunden nach Injektion von ^3H -NSP in die Mucosa hohe Mengen an TCA-unlöslicher Radioaktivität in der Mucosa zu finden waren, waren im Nerv in keinem der Versuche ($n = 4$) nach der jeweiligen Versuchsdauer signifikante Mengen an TCA-unlöslicher Radioaktivität, die auf einen Protein-Transport hätten schließen lassen, festzustellen.

Zur Charakterisierung der nach Injektion von ^3H -NSP in die Mucosa radioaktiv markierten Proteine wurde die Mucosa homogenisiert, die Proteine mit TCA gefällt und mit zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt.

Das nach Coomassie-Färbung sichtbare Gesamtproteinmuster (Abb. 15 A) zeigt eine große Anzahl von Proteinen. Die Proteine, die die relativ höchste Konzentration besitzen, haben ein Molekulargewicht von 66, 25 und 14.5 kD. Der Vergleich mit dem Muster der radioaktiv markierten Proteine, wie es auf dem vom Gel angefertigten Fluorogramm zu sehen ist (Abb. 15 B) zeigt, daß zwar eine Ähnlichkeit der Muster besteht, daß aber nicht alle Proteine entsprechend ihrer relativen Menge markiert sind. So sind einige Proteinflecken auf dem Fluorogramm nicht oder nur ganz schwach wiederzufinden, und umgekehrt sind einige Proteine stark radioaktiv markiert, die nach Coomassie-Färbung kaum zu sehen sind.

3.3.2 Transport nach Injektion in die Nervmitte

Nach Injektion von ^3H -NSP in die Mitte des Riechnervs konnte auch nach mehreren Stunden weder in anterograde noch in retrograde Richtung ein Transport festgestellt werden ($n = 3$). Die TCA-unlösliche Radioaktivität blieb auf einen engen, mehr oder weniger konstant bleibenden Bereich um die Injektionsstelle beschränkt, wie der Vergleich mit einer nach kurzer Versuchsdauer erhaltenen Verteilung zeigt (Abb. 16). Die Verteilungen wurden zum besseren Vergleich auf die maximal gefundene Radioaktivität normiert.

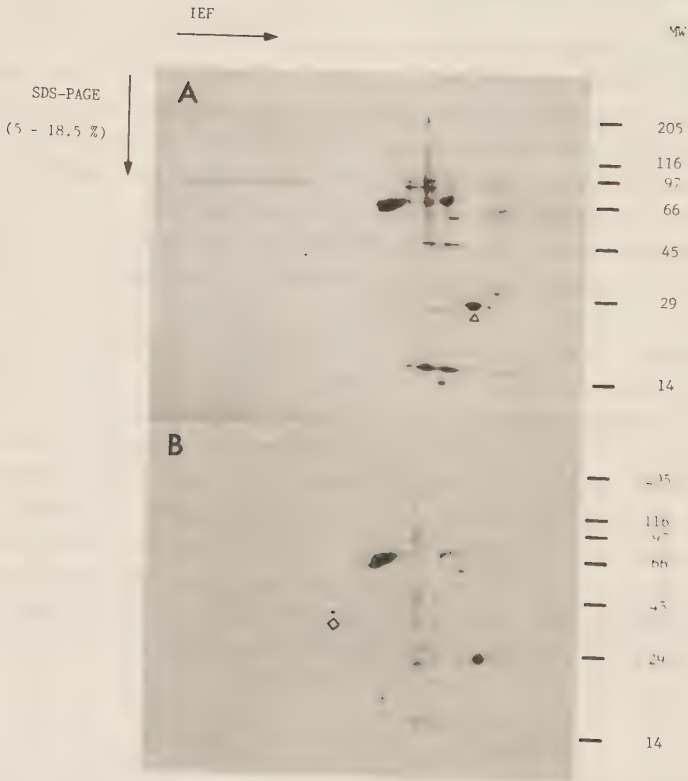


Abb. 15: 2D-Gel zur Charakterisierung der kovalent markierten Proteine nach Injektion von ^3H -NSP in die Mucosa.

A. Proteinmuster nach Färbung mit Coomassie-Blau.

B. Fluorographie des gleichen Gels. Trotz der Ähnlichkeit der Muster ist zu erkennen, daß nicht alle Proteine entsprechend ihrer relativen Menge markiert sind.

Δ: Beispiel für ein Protein, das nach Coomassie-Färbung deutlich, auf dem Fluorogramm aber nicht, oder nur ganz schwach wiederzufinden ist.

◇: Beispiel für ein Protein, das stark radioaktiv markiert ist, aber nach Coomassie-Färbung kaum zu erkennen ist.

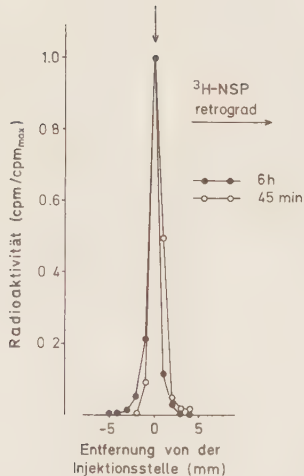


Abb. 16: Versuch zum anterograden und retrograden Transport von kovalent markierten Proteinen nach Injektion von ^3H -NSP in die Mitte des Riechnervs. Der Vergleich einer gefundenen Verteilung der TCA-unlöslichen Radioaktivität nach 6 h (—●—) mit einer Verteilung der TCA-unlöslichen Radioaktivität nach 45 min (—○—) zeigt, daß weder in anterograder noch in retrograder Richtung ein Transport von kovalent markierten Proteinen nachweisbar ist. Die Radioaktivitätsverteilungen sind auf den höchsten Wert (Injektionsstelle) normiert.
cpm_{max}: 72400 (45 min) und 131400 (6 h).

3.3.3 Retrograder Transport

3.3.3.1 Transportprofile

Nach Injektion von ^3H -NSP in den Bulbus olfactorius ließ die nach einigen Stunden Transportdauer gefundene Verteilung der TCA-unlöslichen Radioaktivität entlang des Nerven auf einen aktiven Transport schließen. Die Profile zeigten allerdings im Gegensatz zu den mit HRP gefundenen Profilen keine Gipfel; das transportierte Material wandert stattdessen

in einer zusammenhängenden Welle aus dem Bulbus in den Nerv. Abb. 17 zeigt ein Profil nach 8 Stunden Transportdauer. Da die Front dieser Welle nicht so genau festgelegt werden konnte, wie bei den Transportprofilen, bei denen ein Gipfel auftrat, wurde als Front der Punkt definiert, an dem die Radioaktivität noch mehr als 0.5 % der im gesamten Nerv vorhandenen Radioaktivität ausmachte (zur Definition s.a. Woodward, 1984). Die Auftragung der so gefundenen Front gegen die jeweilige Transportdauer zeigt einen linearen Zusammenhang ($r = 0.81$; s.Abb. 18). Die Steigung der berechneten Regressionsgeraden ergibt eine maximale Geschwindigkeit der endogenen radioaktiv markierten Proteine in retrograder Richtung von 1.13 ± 0.36 mm/h oder 27 ± 8.6 mm/d (19°C).

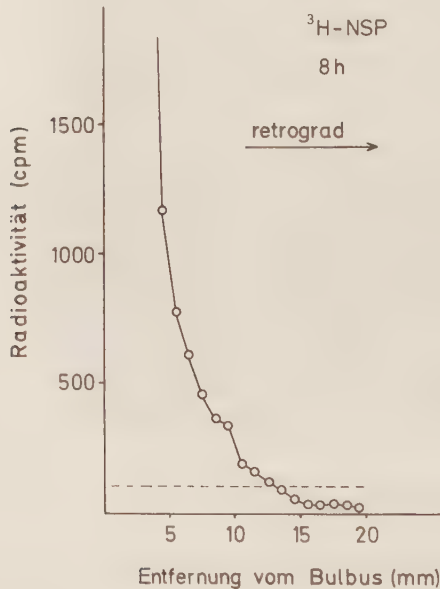


Abb. 17: Retrograder Transport von kovalent markierten Proteinen.

Einige Stunden nach Injektion von ^3H -NSP in den Bulbus zeigt die Verteilung der TCA-unlöslichen Radioaktivität entlang der Nerven Transportprofile, die sich aber von den mit HRP erhaltenen unterscheiden. Das Fehlen eines Gipfels zeigt an, daß das transportierte Material als eine Front oder eine breite Welle den Bulbus verläßt.

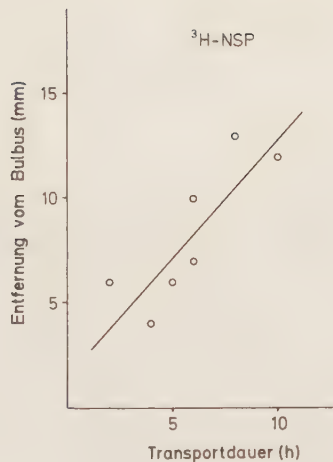


Abb. 18: Retrograder Transport von kovalent markierten Proteinen nach Injektion von $^3\text{H-NSP}$ in den Bulbus.

Die Front der den Bulbus verlassenden Welle (zur Definition s. Text) wurde in Abhängigkeit von der Transportdauer aufgetragen. Die Steigung der berechneten Regressionsgeraden ergibt eine Maximalgeschwindigkeit für den retrograden Transport von kovalent markierten endogenen Proteinen von 27 mm/d.

3.3.3.2 Charakterisierung der markierten Proteine

a) Markierte Proteine an der Injektionsstelle

Zur Charakterisierung der markierten Proteine im Bulbus wurden die Proteine mit zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Das nach Coomassie-Färbung sichtbare Gesamt-Proteinmuster (Abb. 19 A) kann mit dem Muster der radioaktiv markierten Proteine, wie es auf dem vom gleichen Gel angefertigten Fluorogramm zu sehen ist (Abb. 19 B), verglichen werden. Abb. 19 B zeigt, daß viele Proteine markiert werden, und daß eine relativ starke Ähnlichkeit mit dem Proteinmuster (Abb. 19 A) besteht. Qualitativ ist die Mehrzahl der Proteine entsprechend ihrer relativen Menge markiert. Das bedeutet, daß nach Injektion von $^3\text{H-NSP}$ die im Bulbus vorhandenen Proteine weitgehend unspezifisch radioaktiv markiert werden.

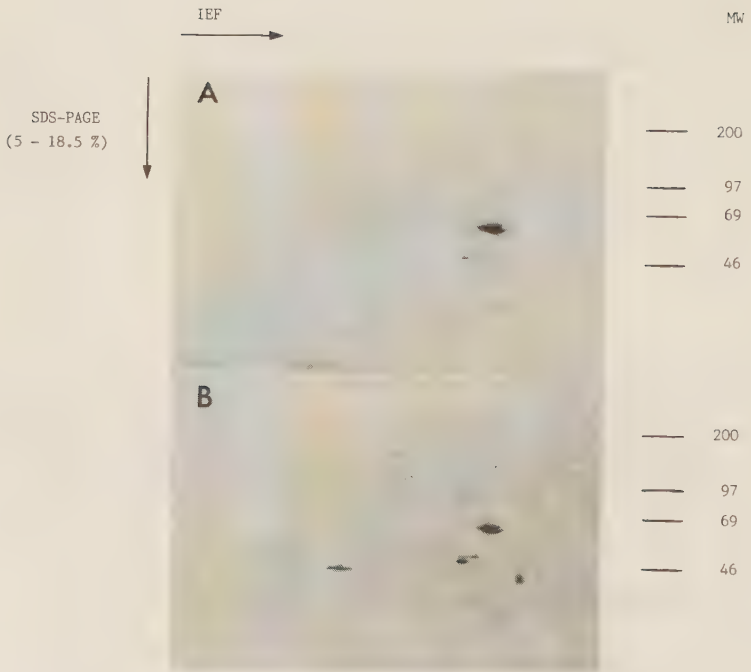


Abb. 19: 2D-Gel zur Charakterisierung der kovalent markierten Proteine im Bulbus.

A. Gesamt-Proteinmuster nach Färbung mit Coomassie-Blau.

B. Fluorographie des gleichen Gels. Es werden viele Proteine radioaktiv markiert. Der Vergleich mit dem Gesamt-Proteinmuster (A) zeigt eine relativ starke Ähnlichkeit.

b) Retrograd transportierte markierte Proteine

Zur Untersuchung der transportierten Proteine wurden nach 10 - 12 Stunden die Nerven herauspräpariert und in 3 mm lange Stücke geschnitten. Die Stücke wurden homogenisiert und die Proteine nach TCA-Fällung mit SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Wie das mit Coomassie-Blau gefärbte Gel zeigt, stimmen die Muster der endogenen Proteine für die einzelnen Nervstücke überein (Abb. 20), d.h. die Verteilung der Proteine entlang des Nervs ist konstant.

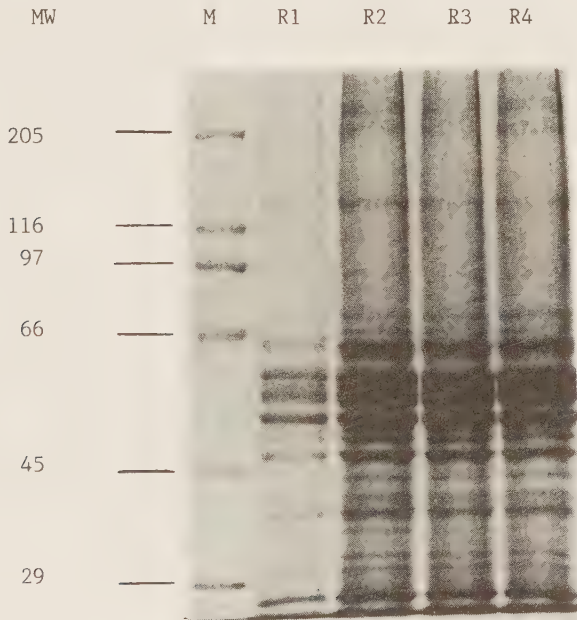


Abb. 20: Muster der endogenen Proteine einzelner Stücke des Riechnervs.

Ein SDS-Gel (7.5%) nach Färbung mit Coomassie-Blau zur Charakterisierung der Proteine einzelner Stücke des Riechnervs zeigt, daß die Muster der endogenen Proteine entlang der Nerven konstant sind. Länge der Nervstücke: 3 mm; im Fall von R1 (dem dem Bulbus am nächsten gelegene Nervstück) wurde weniger Protein auf das Gel aufgetragen als für R2 bis R4.

M: Marker-Proteine (Molekulargewichtsangaben in kD).

Da die in den meisten Stücken gefundenen Radioaktivitätsmengen für die Fluorographie zu gering waren, wurden die einzelnen Bahnen ausgeschnitten, diese in 1 mm Scheibchen geschnitten und deren Radioaktivität bestimmt. Die Auftragung der Radioaktivität gegen die Entfernung vom Start gibt das Muster der radioaktiv markierten Proteine wieder (Abb. 21 B-D). Die Muster der radioaktiven Proteine in den einzelnen Nervstücken sind verschieden von den jeweiligen Gesamt-Proteinmustern, wie der Vergleich mit dem Densitogramm einer Gelbahn zeigt (Abb. 21 A) zeigt.

Die Tatsache, daß die Radioaktivitätsmuster untereinander verschieden sind (Abb. 21), bedeutet, daß die radioaktiv markierten Proteine retrograd transportiert und nicht lokal markiert wurden (z.B. nach Diffusion von ^3H -NSP und anschließender Acylierung). Zusätzlich legen die unterschiedlichen Radioaktivitätsmuster in den einzelnen Nervstücken nahe, daß für verschiedene Proteine unterschiedliche Transportgeschwindigkeiten existieren.

Die Molekulargewichte der retrograd transportierten Proteine sind allgemein relativ klein (Abb. 21); die Molekulargewichte der am stärksten markierten transportierten Proteine liegen bei 27,5, 32,5, 47,5, und 55 kD.

Auf Fluorographien von 2D-Gelen einzelner, bulbushnaher Nervstücke lassen sich komplexe Muster von transportierten Proteinen erkennen (Abb. 22 B), wobei ebenfalls deutlich sichtbar ist, daß v.a. relativ kleine Proteine retrograd transportiert werden. Der Vergleich mit dem zugehörigen Gesamtproteinmuster nach Coomassie-Färbung (Abb. 22 A) verdeutlicht noch einmal die Verschiedenheit der Muster: Im Proteinmuster dominieren die Cytoskelett-Proteine, die auf dem Fluorogramm nicht erkennbar sind, während umgekehrt einige niedermolekulare Proteine zwar stark radioaktiv markiert sind, aber nach Coomassie-Färbung kaum zu sehen sind.

Abb. 21: Retrograder Transport kovalent markierter Proteine.

A. Densitometrisch bestimmtes Profil des Proteinmusters eines Nervstücks nach Färbung mit Coomassie-Blau.

B - D. Muster der kovalent markierten, retrograd transportierten Proteine. Transportdauer: 12 h. Einzelne Gelbahnen wurden ausgeschnitten und in 1 mm-Scheibchen geschnitten. Die Radioaktivität in jedem Scheibchen wurde bestimmt und gegen die Entfernung vom oberen Rand des Trenngels aufgetragen. Die Muster von drei aufeinanderfolgenden Nervstücken (Länge eines jeden Stückes: 3 mm; R1 ist das dem Bulbus am nächsten gelegene Stück) sind dargestellt.

Die Muster sind verschieden vom Muster der nichtradioaktiven Proteine (A). Die Muster von R1 und R2 weisen Unterschiede auf, während die Muster von R2 und R3 sehr ähnlich sind, wenn man von der insgesamt geringeren Radioaktivität in R3 absieht.

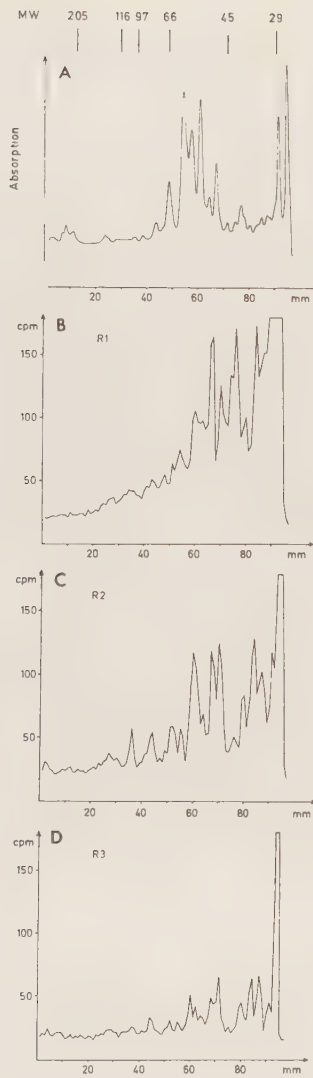


Abb. 21: Retrograder Transport kovalent markierter Proteine.
(Legende s. S. 52)

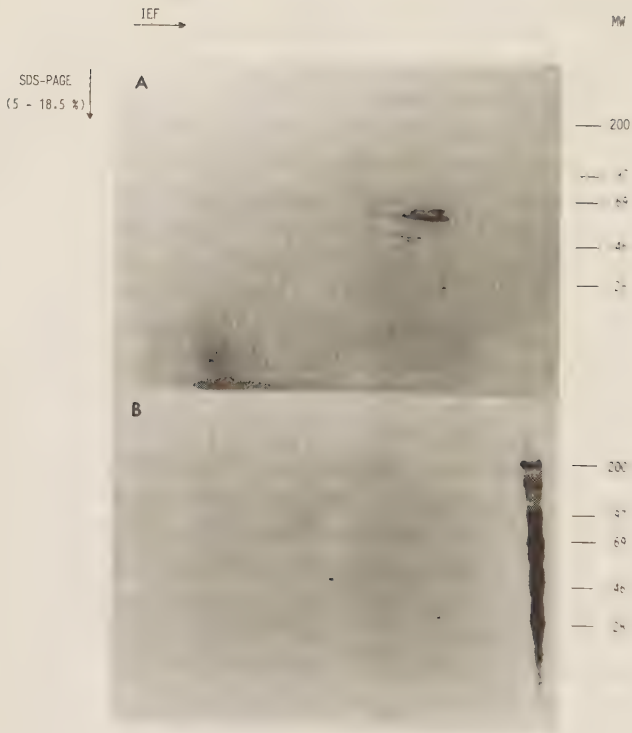


Abb. 22: 2D-Gel zur Charakterisierung der kovalent markierten Proteine im dem Bulbus am nächsten gelegenen Nervstück (R1) 12 h nach Injektion von ^3H -NSP.
 A. Proteinmuster nach Färbung mit Coomassie-Blau.
 B. Fluorographie des gleichen Gels. Das komplexe Muster der markierten Proteine ist vom Proteinmuster (A) deutlich verschieden; v.a. Proteine mit relativ geringem Molekulargewicht sind markiert.

3.4 Transport von Organellen

3.4.1 Art der sich bewegenden Organellen

Mit der Interferenzkontrastmethode nach Nomarski und nachfolgender elektronischer Kontrastverstärkung aufgenommene Bilder eines feinen Axonbündels des Hechtriennervs zeigen eine Reihe länglicher, in Richtung der Längsachse verlaufender Strukturen und einige runde Organellen (s. Abb. 23 A). Es ist wichtig, sich zu vergegenwärtigen, daß nicht einzelne Axone sichtbar sind, sondern ein Bündel von vielleicht einigen hundert Axonen, die aber optisch nicht aufgelöst werden können. Abb. 23B zeigt zum Vergleich eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Längsschnittes durch den Riechnerv, deren Vergrößerung ungefähr der des Videobildes entspricht. Die im Videobild sichtbaren Strukturen sind durch die angewandte lichtmikroskopische Technik auf ein Mehrfaches ihrer realen Dicke optisch "aufgebläht" (Beugungsbild). Durch die starke Strukturierung sind bei dieser Darstellung fast nur die Bewegungen sehr kontrastreicher, runder Organellen zu sehen; die Bewegungen länglicher Organellen (s.u.) sind sehr schwer zu beobachten.

Mit der in Punkt 2.5.5 beschriebenen Methode der Intervallsubtraktion werden dadurch, daß alle stationären Bildteile wegsubtrahiert werden, bewegliche Objekte ganz deutlich sichtbar (s. Abb. 24).

Zwei verschiedene Arten von Organellen werden als transportiert erkannt:

a) runde Organellen mit einem apparenten Durchmesser von $0.5 - 0.7 \mu\text{m}$. Der Kontrast dieser Organellen ist sehr unterschiedlich und zum Teil so schwach, daß einige kontrastärmere nur im laufenden Bild, nicht aber im Standbild (z.B. Abb 24) zu sehen sind. Bei diesen runden Organellen handelt es sich wahrscheinlich um Lysosomen, prälysosomale Strukturen, oder zumindest Lysosomen-ähnliche Organellen (s. Diskussion).

b) Die zweite Klasse transportierter Organellen waren längliche Organellen mit einer apparenten Dicke von ca. $0.5 - 0.8 \mu\text{m}$ und einer Länge von $1.5 - 10 \mu\text{m}$. Bei diesen Organellen handelt es sich aufgrund ihres Erscheinungsbildes mit größter Wahrscheinlichkeit um Mitochondrien (Cooper & Smith, 1974).



Abb. 23: A. AVEC-DIC Videomikrographie eines Bündels von Axonen des Riechnervs. In Längsrichtung der Axone orientierte lineare Strukturen, bei denen es sich nicht um einzelne Axone, sondern wahrscheinlich um Mitochondrien handelt, und runde, lysosomenähnliche Organellen sind zu erkennen. Bild vom Bildschirm. Balken: 2 μm . B. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Längsschnitts des Riechnervs mit niedriger, ungefähr der in A. entsprechender Vergrößerung. Balken: 2 μm . (EM-Aufnahme von Dieter Seitz-Tutter).

3.4.2 Allgemeine Beobachtungen

Die Bewegung der beiden Organellenarten erfolgt im Allgemeinen geradlinig und parallel zur Richtung der Längsachse des Axonbündels in beide, d.h. in anterograder und retrograder Richtung.

Die Organellen bewegen sich dabei nicht ununterbrochen vorwärts, sondern stoppen, nachdem sie eine gewisse Laufstrecke zurückgelegt haben, und nehmen erst nach mehr oder weniger langen Pausen ihre Bewegung wieder auf. Über die durchschnittliche Dauer solcher Pausen kann keine Aussage getroffen werden. Pausen zwischen 2 und 30 sec. sind beobachtet worden, doch gibt es sicher länger dauernde, was daraus zu ersehen ist, daß oft neue, bisher unbewegliche Organellen anfangen sich zu bewegen. Längere Pausen sind auch deshalb schwer zu beobachten, da eine sichere Wiedererkennung von Organellen nach einem längeren Stillstand kaum möglich ist.

Die lysosomenähnlichen Organellen (LLO = lysosome like organelle) bewegen sich in überwiegender Zahl in retrograder Richtung, während die Anzahl von anterograd und retrograd transportierten Mitochondrien annähernd gleich ist. Es gab jedoch auch einzelne Beobachtungs-Sequenzen, in denen überwiegend sich in anterograder Richtung bewegend Mitochondrien, und solche, in denen überwiegend sich in retrograder Richtung bewegend Mitochondrien zu beobachten waren.

Wenn - wahrscheinlich bedingt durch die Präparation - einige Axone nicht geradlinig durch das Blickfeld verliefen, so paßten sich offenbar längere Mitochondrien diesem Verlauf an (s.Abb. 25).

Manchmal zeigten Organellen eine kurzzeitige Richtungsumkehr; extrem selten war eine länger als einige Sekunden dauernde Richtungsumkehr zu beobachten.

Einige Male war zu beobachten, daß zwei Partikel anscheinend zusammenhängend transportiert wurden, wobei es vorkam, daß sie sich nach einiger Zeit trennten und sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit weiterbewegten (s.Abb. 26).

Obwohl es mit der lichtmikroskopischen Methode nicht möglich war, zu entscheiden, ob die Bewegungen zweier Organellen in einem Axon stattfand, so hatte es doch in einigen Fällen den Anschein, daß zwei aus verschiedenen Richtungen kommende Partikel kollidierten und erst nach einer kurzen Pause in ihre jeweilige Richtung weitertransportiert wurden.

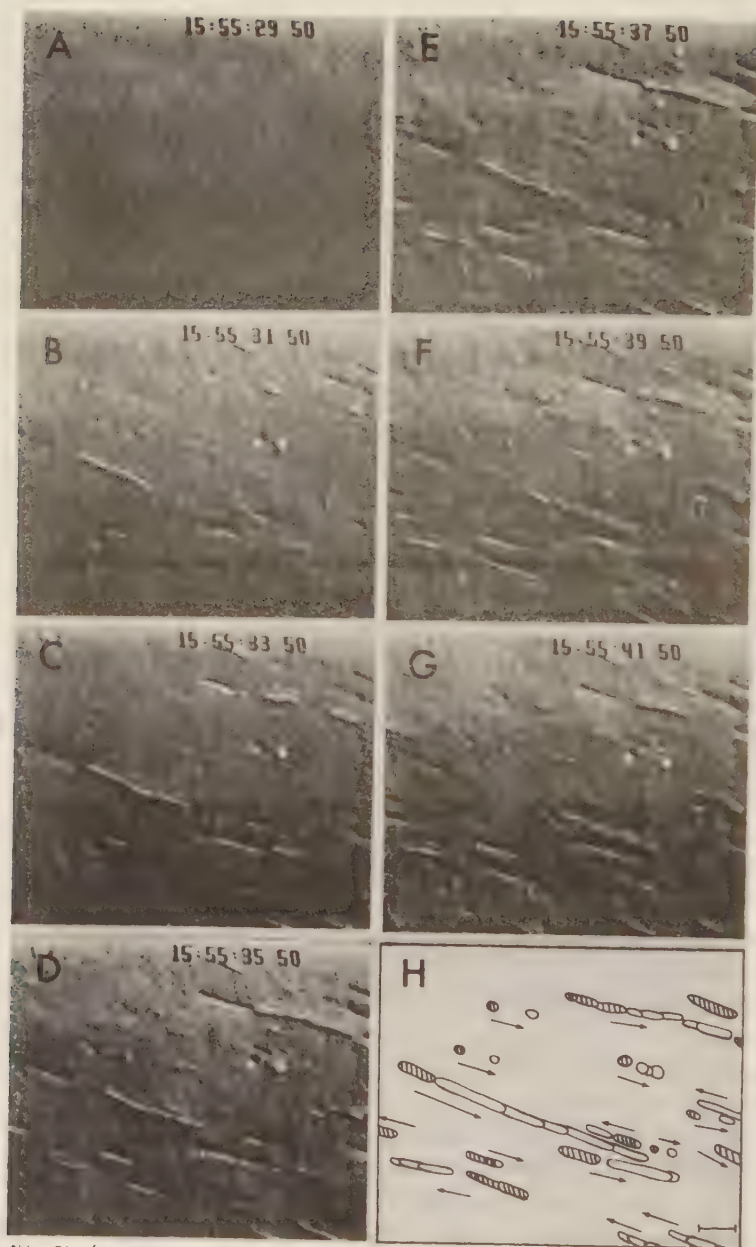


Abb. 24: (Legende s. S. 59)

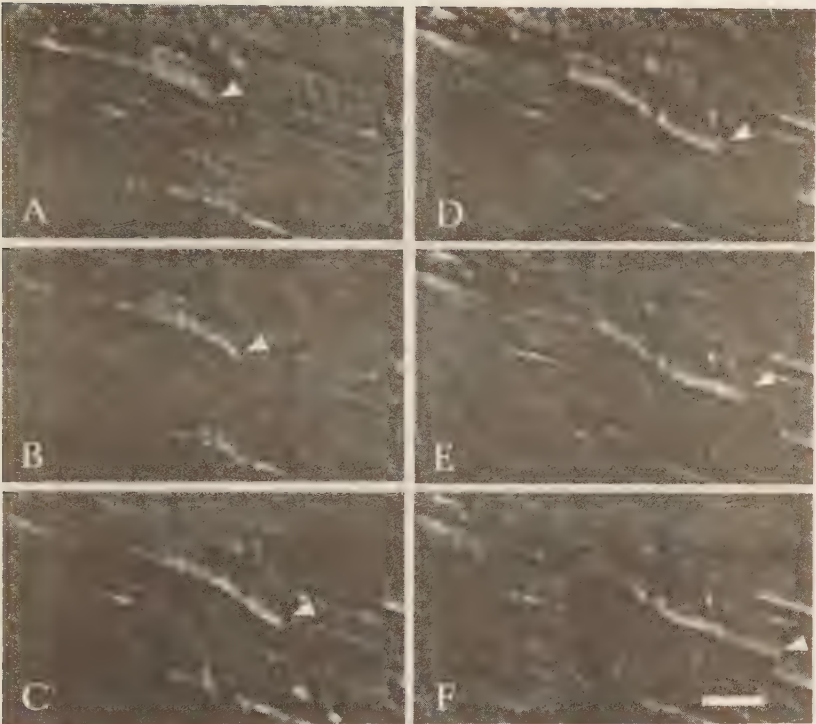


Abb. 25: Bewegung eines Mitochondriums, das sich offenbar dem nicht geradlinigen Verlauf eines Axons anpaßt und dabei vorübergehend eine S-förmige Gestalt (D,E) annimmt. Die Dreiecke markieren die Spitze des in anterograder Richtung transportierten Mitochondriums. Abstand zwischen den einzelnen Bildern: 1 s. Balken: 2 μ m.

Abb. 24: Bewegung von Organellen in einem Bündel von Axonen des Riechnervs beobachtet mit AVEC-DIC Mikroskopie.

A - G. Sequenz von Videomikrographien erzielt mit der "Intervall Subtraktion" - Funktion des Bildprozessors. Nur bewegte Objekte und deren Startpositionen werden dargestellt. Intervall zwischen den einzelnen Aufnahmen: 2 sec. Balken: 2 μ m. H. Zusammenfassende schematische Darstellung der Positionen der bewegten Organellen in der Sequenz A - G. Schraffierte Flächen: Startpositionen der Organellen. Die Pfeile geben die Bewegungsrichtung an. Nach links oben: retrograde Richtung.



Abb. 26: Bewegung von zwei zusammenhängenden Organellen (Pfeilspitzen), die sich trennen und dann mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten (in retrograder Richtung) weitertransportiert werden. Die Zahlen, die in einigen Bildern der Sequenz zu sehen sind, stammen von der Einstellung der digitalen Kontrastverstärkung, die während der Aufnahme dieser Sequenz vorgenommen wurde. Abstand zwischen den Bildern: 1 s. Balken: 2 μ m.

3.4.3 Geschwindigkeit der Organellenbewegung

Lysosomenähnliche Organellen

Die Geschwindigkeit der Partikel wurde wie in 2.5.6. beschrieben gemessen. Die Partikel bewegen sich in retrograder Richtung mit einer mittleren Geschwindigkeit von $1.13 \pm 0.55 \mu\text{m/s}$ (20°C) ($n = 134$). In anterograder Richtung beträgt die mittlere Geschwindigkeit $1.40 \pm 0.54 \mu\text{m/s}$ ($n = 40$) (s. Abb. 27). Der Unterschied zwischen diesen beiden Werten ist statistisch nicht signifikant ($\alpha = 0.05$; Kolmogorov-Smirnoff-Test nach Siegel (1985)).

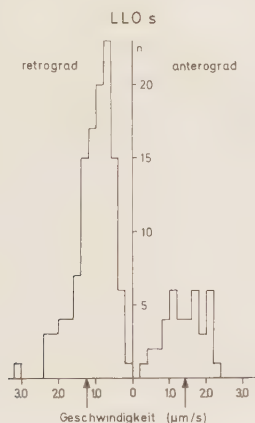


Abb. 27: Verteilung der Geschwindigkeiten der lysosomenähnlichen Organellen (LLOs). Diese Organellen zeigen Durchschnittsgeschwindigkeiten (angezeigt durch die Pfeile) von $1.45 \pm 0.5 \mu\text{m/s}$ in anterograder Richtung und $1.22 \pm 0.5 \mu\text{m/s}$ in retrograder Richtung. Der Unterschied zwischen diesen zwei Geschwindigkeiten ist statistisch nicht signifikant. $T = 20^\circ\text{C}$.

Mitochondrien

Die mittlere Geschwindigkeit von Mitochondrien in retrograder Richtung war mit $1.16 \pm 0.50 \mu\text{m/s}$ ($n = 92$) annähernd doppelt so groß als die in anterograder Richtung ($0.60 \pm 0.18 \mu\text{m/s}$; $n = 89$) (s. Abb. 28). Der

Unterschied zwischen den beiden Geschwindigkeiten ist statistisch signifikant ($\alpha = 0.05$; Kolmogorov-Smirnoff-Test nach Siegel (1985)).

Als eine Erklärungsmöglichkeit für diesen Unterschied wurde geprüft, ob sich die Mitochondrien, die sich in anterograder Richtung bewegen, hinsichtlich ihrer Länge von denen, die sich in retrograder Richtung bewegen, unterscheiden. Letztere haben eine Länge von $3.29 \pm 1.38 \mu\text{m}$, gegenüber einer mittleren Länge von $3.33 \pm 1.46 \mu\text{m}$ für die anterograde Richtung, d.h. die Längen der in anterograder und retrograder Richtung transportierten Mitochondrien sind nicht verschieden. Es wurde keine Korrelation zwischen der Länge der Mitochondrien und ihrer jeweiligen Geschwindigkeit gefunden (s.Abb. 29).

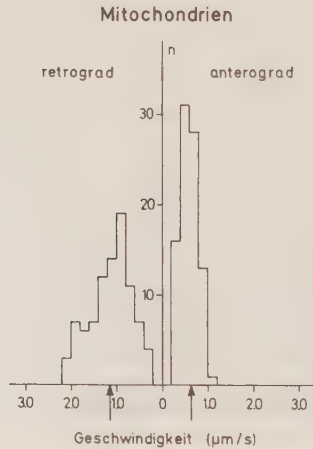


Abb. 28: Verteilung der Geschwindigkeiten der Mitochondrien.

Die Mitochondrien zeigen Durchschnittsgeschwindigkeiten (angezeigt durch die Pfeile) von $0.65 \pm 0.28 \mu\text{m/s}$ in anterograder Richtung und $1.15 \pm 0.39 \mu\text{m/s}$ in retrograder Richtung, d.h. die Durchschnittsgeschwindigkeit der in retrograder Richtung transportierten Mitochondrien ist ungefähr doppelt so groß wie der in anterograder Richtung transportierten. $T = 20^\circ\text{C}$.

Mitochondrien

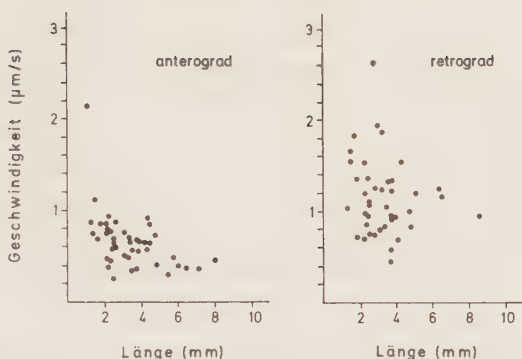


Abb. 29: Geschwindigkeit der Mitochondrien in Abhängigkeit von ihrer Länge.

Es besteht für beide Richtungen keine Korrelation zwischen der Länge der Mitochondrien und ihrer Geschwindigkeit.

In Tabelle II sind die Geschwindigkeiten der Organellen und die in den biochemischen Versuchen gefundenen Geschwindigkeiten zusammengefaßt.

3.4.4 Hemmstoffe des Organellentransports

Colchizin

Für Colchizin war schon gezeigt worden, daß es den axonalen Transport von ^3H -Leucin und von HRP im Hechtriechnerv hemmt (s.o.). Um zu untersuchen, ob auch die Organellenbewegung durch Colchizin gehemmt wird, wurde zuerst die Organellenbewegung unter normalen Bedingungen beobachtet, und dann die normale Ringerlösung durch Ringerlösung ersetzt, die 0.1 mM Colchizin enthielt. Nach einigen Minuten war gegenüber den normalen Bedingungen eine deutlich geringere Anzahl an transportierten Organellen zu beobachten. Nach ca. 30 min war die Hemmung vollständig, d.h. es war keine Organellenbewegung mehr sichtbar. Diese Hemmung konnte auch durch wiederholtes Perfundieren mit normalem Ringer nicht wieder rückgängig gemacht werden.

Tabelle II: Geschwindigkeiten des axonalen Transports im Riechnerv des Hechts

Substanz	ANTEROGRADE		RETROGRADE	
	Markierungsexperimente (Populationsgeschwindigkeiten, v_{max})		Injektionsstelle	
	Bereich der Zellkörper (Mucosa olfactoria)	Nerv	Nerv	Synapsenregion (Bulbus olfactorius)
^3H -Leucin	150 mm/d ¹	36 mm/d	46 mm/d	---
^3H - β -Alanin	150 mm/d ²	---	---	---
3-O- ^3H -Methyl-D-Glucose ²	150 mm/d	---	---	---
Carboxyfluorescein	---	kein Transport	kein Transport	---
^{14}C -Inulin	---	kein Transport	kein Transport	---
HRP	25 mm/d	kein Transport ³	20 - 30 mm/d ³	25 mm/d
^3H -WGA ³	kein Transport	kein Transport	kein Transport	26 mm/d
Proteine markiert mit: ^3H -Leucin ⁴	150 mm/d	kein Transport	kein Transport	---
^3H -NSP	kein Transport	kein Transport	kein Transport	27 mm/d
lysosomenähnliche Organellen	1.45 $\pm$ 0.5 $\mu\text{m/s}$ (125 mm/d)		1.22 $\pm$ 0.5 $\mu\text{m/s}$ (105 mm/d)	
Mitochondrien	0.65 $\pm$ 0.28 $\mu\text{m/s}$ (56 mm/d)		1.15 $\pm$ 0.39 $\mu\text{m/s}$ (100 mm/d)	

---: keine Ergebnisse vorliegend

1) Schmid, G. et al., 1983; 2) Weiss, 1982c; 3) Buchner, 1983; 4) Gross & Kreuzberg, 1978.

Triethylblei

Wurde TriEL dem Hechtringer zugesetzt und das Präparat damit perfundiert, zeigte sich ab einer Konzentration von $7.5 \mu\text{M}$ eine schnell eintretende, völlige Hemmung der Organellenbewegung, die irreversibel war. Bei geringerer Konzentration war innerhalb von 30 min keine Hemmung erkennbar.

Zumindest bei der höchsten verwendeten Konzentration ($10 \mu\text{M}$) waren deutliche Veränderungen der Struktur des Axonbündels zu erkennen. Diese waren gekennzeichnet durch das Auftreten von blasenförmigen Bereichen (s.Abb. 30 B), in denen eine ungeordnete Bewegung von Organellen und seitliche, "wabernde" Bewegungen länglicher Strukturen, wahrscheinlich hervorgerufen durch Brown'sche Molekularbewegung, zu beobachten waren.

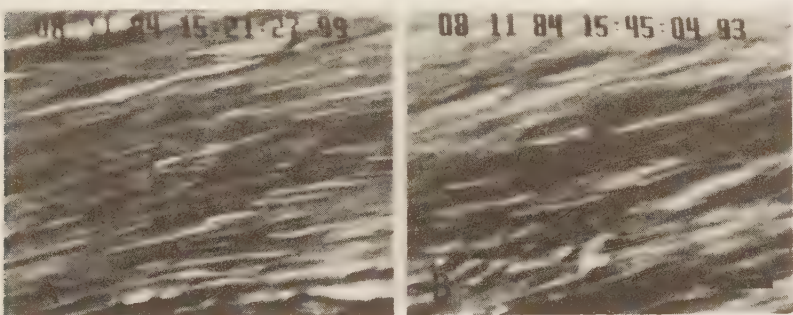


Abb. 30: AVEC-DIC Videomikrographie eines Bündels von Axonen des Riechnervs vor (A) und nach (B) Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ TriEL.

Nach Behandlung mit TriEL ist der Transport von Organellen gehemmt und es treten deutliche Veränderungen der Struktur des Axonbündels auf. In B) sind im Unterschied zu A) blasenförmige Bereiche zu sehen, in denen eine ungeordnete, wahrscheinlich durch Brown'sche Molekularbewegung hervorgerufene Bewegung von Organellen zu beobachten war. Balken: $3 \mu\text{m}$.

EHNA

Nach Perfusion des Präparats mit Ringer, der 2 mM EHNA enthielt, war eine langsam (nach ca 20 min) eintretende Hemmung der Organellenbewegung zu beobachten. Diese Hemmung war im Gegensatz zu der mit Colchizin und TriEL nicht vollständig. Die Anzahl der sich bewegenden Organellen nahm während der Behandlung mit EHNA für beide, retrograde und antero-

grade Richtung ab (s. Abb. 31). Dabei waren die mittleren Geschwindigkeiten für beide Organellenarten sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung geringer als unter Kontrollbedingungen (s. Abb. 32).

Die Hemmung des Organellentransports war – allerdings nicht in vollem Umfang – reversibel: 10 – 15 Minuten nach Entfernen des EHNA-haltigen Ringers stieg die Anzahl der sich bewegenden Organellen (LLOs und Mitochondrien) für beide Richtungen wieder an (s. Abb. 31). Die Geschwindigkeit der Organellen war ebenfalls wieder höher als unter der Einwirkung von EHNA (s. Abb. 32).

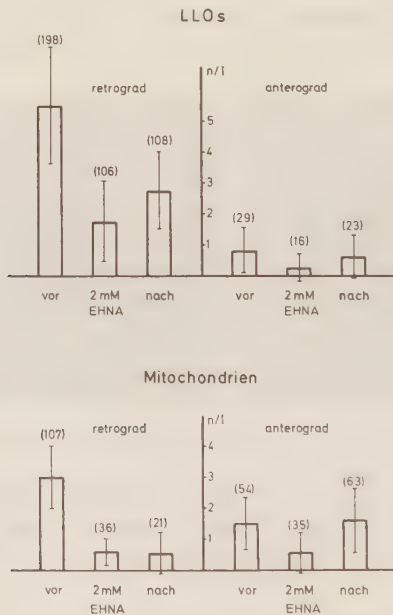


Abb. 31: Hemmung des bidirektionalen Transports von Organellen durch EHNA (Anzahl der transportierten Organellen).

Die Anzahl der sich bewegenden Organellen wurden während der ersten 12 Sekunden (erstes Intervall) jeder auf Videoband aufgezeichneten Minute bestimmt. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung der Anzahl der Organellen pro Intervall (n/I) für Beobachtungssequenzen vor (17 min), während (21 min) und nach (10 min) der Behandlung des Axonbündels mit 2 mM EHNA. Die Werte zeigen, daß die Anzahl der sich bewegenden Organellen während der Behandlung mit 2 mM EHNA in retrograder und anterograder Richtung abnimmt. Nach Entfernen von EHNA steigt die Anzahl der bewegten Organellen wieder an, doch ist die Hemmung mit 2 mM EHNA nicht in vollem Umfang reversibel. Zahlen in Klammern: Gesamtzahl der Organellen.

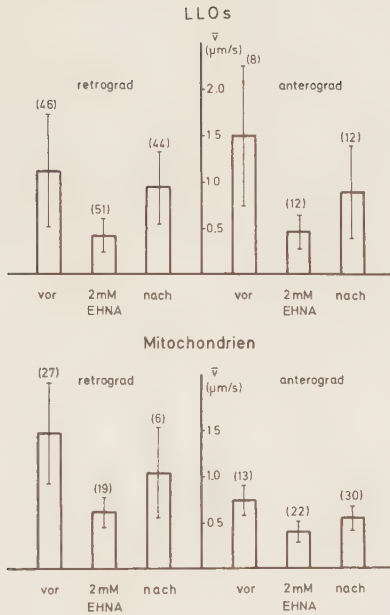


Abb. 32: Hemmung der Geschwindigkeit des bidirektionalen Transports von Organellen durch EHNA.

Die Geschwindigkeit von Organellen für Sequenzen vor, während und nach Behandlung eines Axonbündels mit 2 mM EHNA wurde bestimmt (Zahlen in Klammern: Anzahl der ausgewerteten Organellen). Die Geschwindigkeit sowohl der lysosomenähnlichen Organellen als auch der Mitochondrien nimmt während der Behandlung mit 2 mM EHNA für beide, retrograde und anterograde Richtung ab. Nach Entfernen von EHNA steigt die Geschwindigkeit der Organellen wieder an, doch ist die Hemmung nicht in vollem Umfang reversibel.

3.4.5 Feinanalyse der Organellenbewegung

Die Ergebnisse der computergestützten Analyse der Feinbewegungen der Organellen soll im Wesentlichen anhand des Vergleichs zweier typischer Partikel aus einem Versuch geschildert werden (Anzahl der mit dieser Methode ausgewerteten Organellen : $n = 29$). Dabei wird ein in antero-

grader Richtung transportiertes Organell mit einem in retrograder Richtung transportierten Organell verglichen. Darüber hinaus werden Mittelwerte oder Zusammenfassungen der Ergebnisse von mehreren Organellen dargestellt.

Abb. 33 zeigt für einige Organellen des gleichen Versuchs die Bahn ihrer Bewegung, dargestellt durch ihre Position auf dem Bildschirm (umgerechnet in μm). Abb. 34 zeigt für die beiden Beispiel-Organellen die x- und y-Komponente der Bewegung in Abhängigkeit von der Zeit. In anterograder Richtung transportierte Organellen laufen bei diesem Versuch auf dem Bildschirm von rechts oben nach links unten, d.h. für sie nehmen x- und y-Werte mit der Zeit ab.

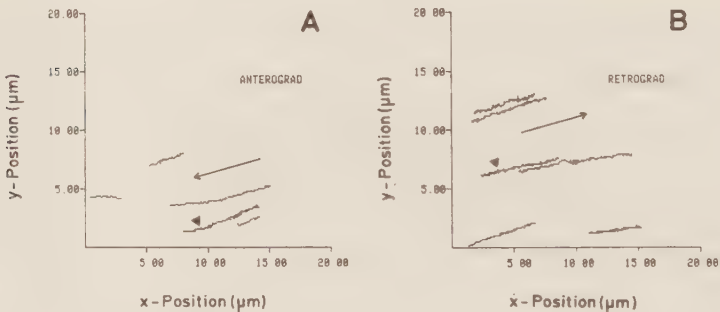


Abb. 33: Bahnen von Organellen eines Versuchs.

A: Anterograde Richtung; B: retrograde Richtung.

Die Pfeile zeigen die Richtung der Bewegung auf dem Bildschirm.

Die Dreiecke kennzeichnen die beiden Organellen, an deren Beispiel die Ergebnisse der Feinanalyse dargestellt werden.

Da die Bewegung der Organellen in jedem Versuch nicht oder nicht genau parallel zu einer der beiden Achsen verlief, wurde für die Ermittlung der Geschwindigkeit zunächst die jeweilige Entfernung des Partikels vom Startpunkt errechnet und in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt (Abb. 35). Dabei wurde jeweils die Entfernung in der Hauptbewegungsrichtung mit positivem Vorzeichen versehen; eine Abnahme der Entfernung bedeutet eine kurzfristige Richtungsumkehr. Die Steigungen der berechneten Regressionsgeraden geben die mittlere Geschwindigkeit der

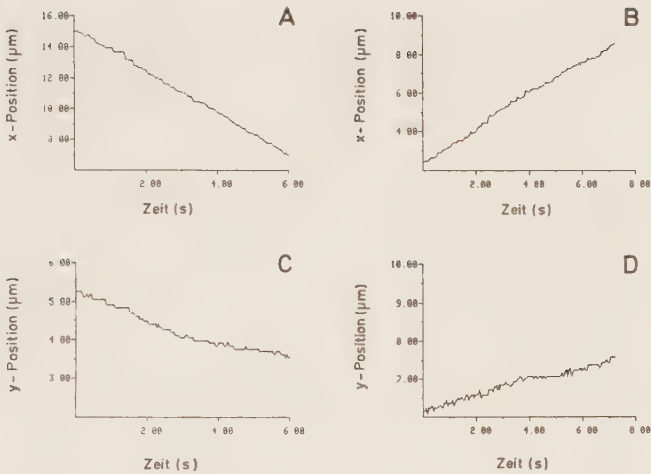


Abb. 34: Abhängigkeit der x- und y-Koordinaten jeweils für das in anterograder Richtung (A,C) und das in retrograde Richtung (B,D) transportierte Beispielorganell.

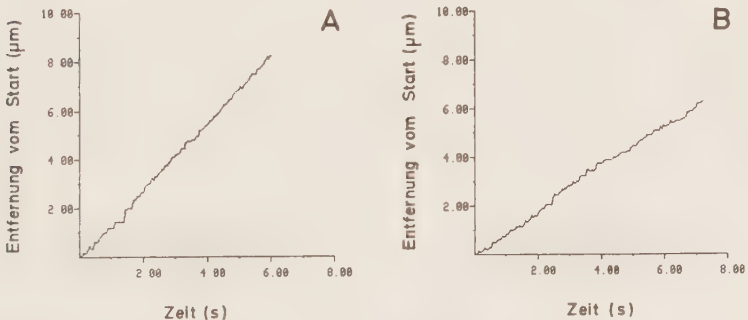


Abb. 35: Abhängigkeit der Entfernung vom Startpunkt von der Zeit.

Da die Hauptbewegungsrichtung meist nicht parallel zur x- oder y-Achse verlief, war es zur Ermittlung der mittleren Geschwindigkeit notwendig, die Entfernung vom Startpunkt in Abhängigkeit von der Zeit zu berechnen. Dargestellt sind die Funktionen jeweils für das anterograde (A) und das retrograde (B) Beispielorganell. Die Steigungen der errechneten Regressionsgeraden (nicht eingezeichnet) ergeben eine mittlere Geschwindigkeit von $1.40 \mu\text{m/s}$ für das anterograd transportierte Organell und $0.89 \mu\text{m/s}$ für das retrograd transportierte. In den folgenden Abbildungen sind in (A) immer Daten für die anterograde Richtung, in (B) für retrograde Richtung dargestellt.

Organellen an. Sie beträgt für das anterograde Beispielpartikel 1.40 $\mu\text{m/s}$ und 0.89 $\mu\text{m/s}$ für das retrograde. Die relativ geringen Abweichungen der Funktion von den Regressionsgeraden, d.h. der Schwankungen um die mittlere Geschwindigkeit lassen erkennen, daß die Bewegungen der Organellen in beiden Richtungen relativ geradlinig sind (vgl. auch Abb. 34).

Die Verteilung der Momentangeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Zeit zeigt Abb. 36. Allerdings werden bei der hier erfolgten Berechnung der Momentangeschwindigkeiten aus den Wegdifferenzen aufeinanderfolgender Bilder durch einfache Differenzenbildung hohe Frequenzen stark überbetont; man erhält so keine zuverlässigen Werte für die realen Momentangeschwindigkeiten (Koles et al., 1982a). Deshalb muß die Bewegung gefiltert werden. Dazu wird entweder eine andere Art der Differenzierung (mit einem differenzierenden Filter) durchgeführt (Koles et al., 1982a), oder – wie in der vorliegenden Arbeit – ein digitaler Tiefpaß-Filter mit Butterworth-Charakteristik angewendet (Keller, 1986).

Dazu muß zunächst die Durchschnittsbewegung (Trend) von den Daten abgezogen werden; das Ergebnis dieser Berechnung ist eine Darstellung

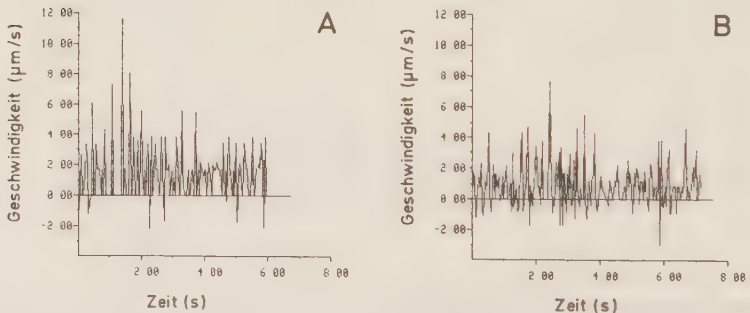


Abb. 36: Momentangeschwindigkeit der Organellen in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Geschwindigkeiten wurden durch einfache Differenzenbildung (40 ms Zeitintervalle) berechnet und sind daher stark verrauscht. Diese Art der Berechnung gibt die Momentangeschwindigkeit nicht adäquat wieder (s. Text) und wurde daher für weitere Berechnungen nicht verwendet.

der trendfreien Bewegung (s. Abb. 37), die durch den größeren Maßstab die Abweichungen von der mittleren Bewegung deutlicher erkennen läßt. Sie sind für beide Richtungen in etwa gleich groß.

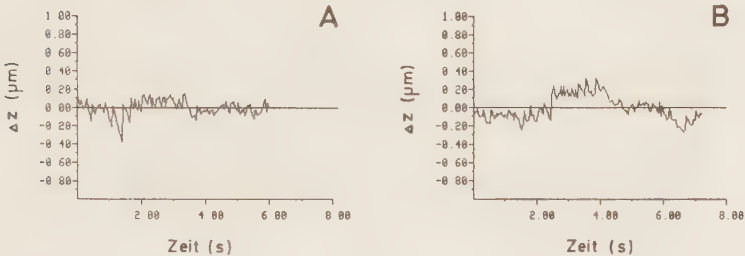


Abb. 37: "Trendfreie" Bewegung der Organellen.

Von den Entfernungsfunktionen (Abb. 35) wurden die Regressionsgeraden subtrahiert.
 Δz : Abweichung von der mittleren Bewegung.

Ein Amplitudenspektrum (s. z.B. Hesselmann, 1983; Time/Data Monograph Series, 1966) der trendfreien Bewegung (ungefiltert) zeigt, daß für beide Richtungen in signifikanter Größe nur niedrige Frequenzen auftreten (s. Abb. 38). Dies gilt in verstärktem Maß, wenn die Amplitudenspektren mehrerer Organellen aufsummiert werden (Abb. 39). Diese Frequenzverteilung ist ein Hinweis auf das Vorliegen einer relativ

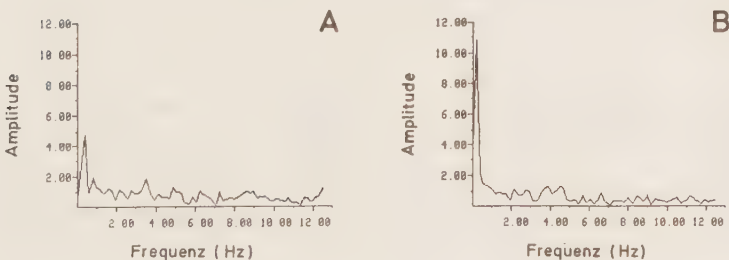


Abb. 38: Amplitudenspektrum der Organellenbewegung.

Für die beiden Beispielorganellen wurde jeweils das Amplitudenspektrum berechnet.

gleichmäßigen Bewegung und zeigt, daß die Berechnung der Momentangeschwindigkeit durch einfache Differenzenbildung (s. Abb. 36) nicht geeignet war, die Momentangeschwindigkeit korrekt zu bestimmen.

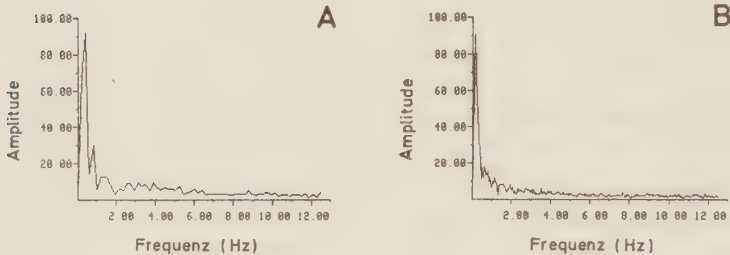


Abb. 39: Amplitudenspektrum der Organellenbewegung

Die Amplitudenspektren von jeweils 4 Organellen wurden aufsummiert. Die Summenspektren zeigen besonders deutlich, daß nur relativ niedrige Frequenzen ($< 2\text{ Hz}$) in der Bewegung der Organellen auftreten.

Abb. 40 zeigt die durch eine Filterung mit einer oberen Frequenz von 2 Hz geglättete Entfernungsfunktionen. Die sich aus diesen gefilterten Daten ergebenden Momentangeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Zeit zeigt Abb. 41; die Häufigkeitsverteilung der Momentangeschwindigkeiten jeweils eines Partikels ist in einem Histogramm dargestellt (Abb. 42). Der Mittelwert der Momentangeschwindigkeit beträgt $1.38\text{ }\mu\text{m/s}$ für das anterograde Partikel und $0.87\text{ }\mu\text{m/sec}$ für das retrograde.

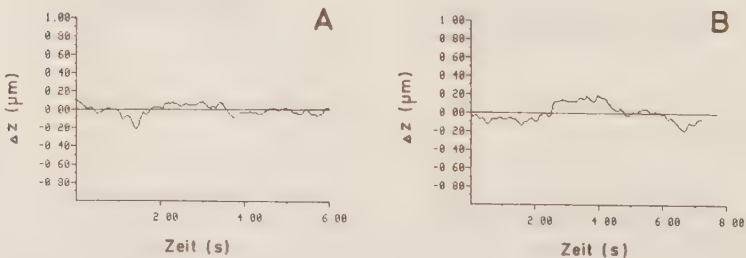


Abb. 40: Gefilterte Bewegungsfunktion der Organellen.

Die Funktion der trendfreien Bewegung (s. Abb. 37) wurde mit einem digitalen Tiefpaßfilter mit einer oberen Frequenz von 2 Hz gefiltert.

Δz : Abweichung von der mittleren Bewegung.

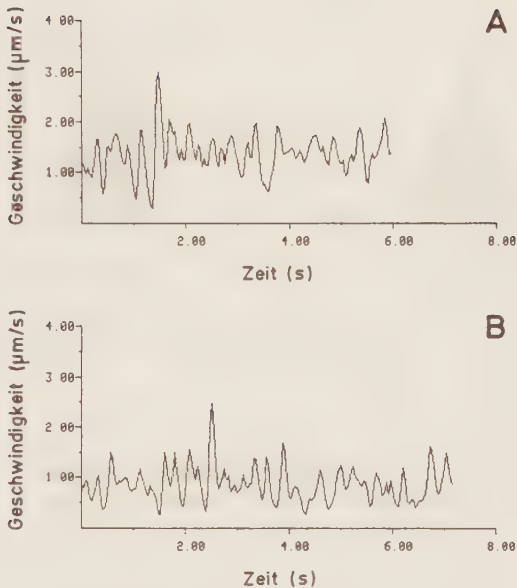


Abb. 41: Momentangeschwindigkeit der Organellen in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Abhängigkeit der Momentangeschwindigkeit der Organellen von der Zeit zeigt nach Filterung einen im Vergleich zur ungefilterten Bewegung (s. Abb. 36) wesentlich "glatteren" Verlauf. Trotzdem sind relativ große Geschwindigkeitssprünge zu beobachten. So steigt z.B. die Geschwindigkeit des anterograden Beispielorganelles innerhalb von ca. 0.15 s von 0.3 µm/s auf 3 µm/s.

Die auftretenden deutlichen Minima und Maxima in der Funktion der Momentangeschwindigkeiten (vgl. Abb. 41) zeigen, daß unregelmäßige, relativ schnelle Geschwindigkeitssprünge auftreten. So kann sich z.B. die Momentangeschwindigkeit innerhalb von 0.15 s von 0.3 µm/s auf 3 µm/s erhöhen.

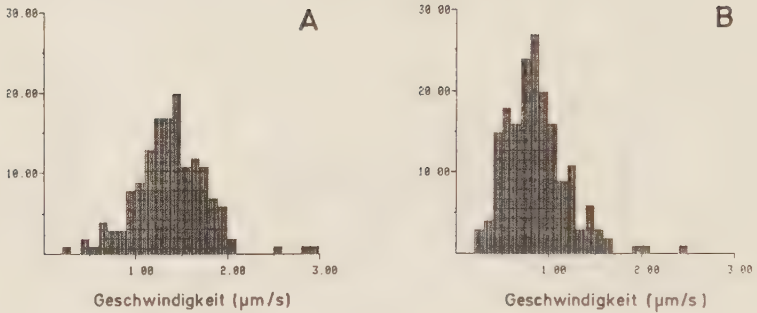


Abb. 42: Histogramme der Momentangeschwindigkeiten der gefilterten Bewegungsfunktion. Der Mittelwert der Geschwindigkeit beträgt für die anterograde Richtung $1.38 \mu\text{m/s}$ und $0.87 \mu\text{m/s}$ für die retrograde Richtung. Klassenbreite: $0.1 \mu\text{m/s}$.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Ergebnisse der Feinanalyse keine Unterschiede zwischen den Bewegungen von anterograd und retrograd transportierten Organellen erkennen lassen. Auch die beiden Beispielpartikel zeigen trotz einer unterschiedlichen mittleren Geschwindigkeit bei der Analyse mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung keine großen Unterschiede in ihrem Bewegungsverhalten.

4. Diskussion

4.1. Transport von niedermolekularen Substanzen

4.1.1 Bidirektionaler Transport von Leucin

Injektion

Nach der Injektion befindet sich der überwiegende Teil des injizierten ^3H -Leucin, wie auch der anderen Markierungssubstanzen, im Extrazellulärraum, da der Durchmesser der Spitze der Glaskapillare (ca 30 μm) erheblich größer ist als der Durchmesser der Axone. Durch aktive Aufnahme oder durch Diffusion durch beschädigte Membranen gelangt ^3H -Leucin in die Zellen. Dort und auch im Extrazellulärraum unterliegt es der Diffusion, die von aktiven Transportvorgängen unterschieden werden muß (vgl. 4.1.2).

Trotz einiger Vorversuche, die zu einer guten Korrelation zwischen Anzahl der Impulse bzw. Druck und Aktivität der Proben führten, war die injizierte Menge an Markierungssubstanz in den einzelnen Versuchen unterschiedlich groß. Das lag wahrscheinlich daran, daß Variationen im Gewebedruck, möglicherweise abhängig von der Einstichtiefe, auftraten und/oder die Kapillaren manchmal verstopften.

Es muß daher die Annahme gemacht werden, daß die für den Transport zur Verfügung stehende Menge an Material die Transportgeschwindigkeit nicht wesentlich beeinflusst. Diese Annahme erscheint angesichts der Befunde über eine Abhängigkeit der Transportgeschwindigkeit von der Transportmenge in Wirbeltiernerven gerechtfertigt, wonach eine Beeinflussung der Geschwindigkeit nur für den Organellentransport wahrscheinlich scheint (Schwartz et al., 1976; Litchy & Brimijoin, 1982; Bisby, 1983; Smith, 1986).

Transportgeschwindigkeit

In der vorliegenden Arbeit gelang es, nach Injektion von ^3H -Leucin in die Mitte des Riechnervs einen bidirektionalen Transport nachzuweisen. ^3H -Leucin wird dabei von der Injektionsstelle aus in einem Gipfel sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung transportiert. Die Menge des im Gipfel transportierten ^3H -Leucins nimmt mit zunehmender

Transportdauer ab, was auch für den Transport von Aminosäuren vom Zellkörper aus gefunden wurde (Csanyi et al., 1973; Weiss, 1982c; Schmid, G. et al., 1983). Dies hat zur Folge, daß sich nach einer Transportdauer von mehr als 5 - 6 Stunden kein Gipfel mehr nachweisen läßt. Auf diesen raschen Verlust aus dem Transportkompartiment kann es nach Schmid, G. et al. (1983) zurückzuführen sein, daß in früheren Arbeiten kein Transport von niedermolekularen Substanzen zu den Nervenendigungen gefunden wurde (z.B. Neale et al., 1974; Karlsson, 1977).

Aus den gefundenen Transportprofilen ergab sich eine maximale Geschwindigkeit von 36 mm/d (19°C) in anterograder Richtung und von 46 mm/d (19°C) in retrograder Richtung. Diese Geschwindigkeiten sind statistisch nicht signifikant verschieden. Mit dem für den axonalen Transport von Proteinen im Hechtriechnerv gefundenen Q_{10} -Wert von 2.44 (Gross & Kreutzberg, 1978) ergeben sich daraus Geschwindigkeiten von 174 bzw. 239 mm/d bei 37°C .

Die gefundenen Geschwindigkeiten sind wesentlich geringer als die des anterograden Transports von ^3H -Leucin, das nach Applikation an der Mucosa in die Zellkörper aufgenommen wurde (s. Tab. II, Schmid, G. et al., 1983), was eine Lokalisation in verschiedenen Transportkompartimenten nahelegt (s.u.). Während die Geschwindigkeit des Leucin-Transports vom Zellkörper aus mit der Geschwindigkeit des anterograden Transports von Proteinen nach Markierung mit ^3H -Leucin identisch ist (s. Tab. II; Gross & Kreutzberg, 1978), liegen die gefundenen Geschwindigkeiten für den Transport von Leucin nach Injektion in die Nervmitte eher in einem Bereich, der auch für den anterograden und retrograden Transport von exogenen Proteinen gefunden wurde (s. Tab. II).

Daten für die Geschwindigkeit des Transports von freien Aminosäuren waren bisher, neben den am Hechtriechnerv gewonnenen Daten, nur von Arbeiten am optischen System im Goldfisch (Csanyi et al., 1973), an *Aplysia* (Price et al., 1979; Carlson et al., 1984) und Hummer (Woodward, 1984) bekannt. Csanyi et al. (1973) fanden nach Injektion in den Bereich der Zellkörper Geschwindigkeiten, die denen von Proteinen im gleichen System entsprechen. Für den Hummer wurden für den anterograden Transport der Aminosäure-Transmitter GABA und Glutamat Geschwindigkeiten von 16 - 22 mm/d bei 12°C ermittelt. Mit einem Q_{10} -Wert von 2.5 ergeben sich daraus Werte von ca. 30 - 40 mm/d bei 19°C , die mit den in dieser Arbeit

am Hecht gefundenen Werte für Leucin gut übereinstimmen.

Die Geschwindigkeiten der Aminosäure-Transmitter GABA und Glutamat sind im Hummer höher als die anderer Aminosäuren (Woodward, 1984). Ähnliches wird von Price et al. (1979) für *Aplysia* berichtet, wo die Geschwindigkeit des Transports von Glycin (dem Transmitter in den untersuchten Neuronen) für beide Richtungen gleich (70 mm/d bei 20 - 22°C) und höher als die Transportgeschwindigkeit anderer Aminosäuren (< 40 mm/d) war.

Es wurden aber nicht nur verschiedene Geschwindigkeiten für verschiedene Aminosäuren beschrieben, sondern auch zwei unterschiedliche Geschwindigkeiten für den (retrograden) Transport einer Aminosäure (Carlson, et al., 1984), was die Autoren auf ein zweites, langsames Transportkompartiment zurückführen. Ob ein solches auch im Hechtrienchennerv vorhanden ist, konnte nicht entschieden werden. Aufgrund der relativ starken Streuung der Werte für die Front der Hauptmasse der Radioaktivität (s. Abb. 7) konnte keine Aussage getroffen werden, ob eine möglicherweise vorhandene Ausbreitung auf Diffusion oder einem langsamen Transport beruht.

Transportform

Da im Axon keine Proteinsynthese stattfindet, kann ^3H -Leucin nicht in neu synthetisierten Proteinen eingebaut transportiert werden. Wie gezeigt, bleibt die TCA-unlösliche, d.h. proteingebundene Radioaktivität auf einen engen Bereich um die Injektionsstelle beschränkt. Diese radioaktiv markierten Proteine sind sehr wahrscheinlich ein Ergebnis der Proteinsynthese in Gliazellen.

Die gefundenen Transportprofile geben daher den Transport von freiem Leucin wieder. Ein Transport von freien Aminosäuren wurde auch in anderen Systemen sowohl in anterograder (Csanyi et al., 1973; Woodward, 1984) als auch in retrograder Richtung (Carlson et al., 1984) beschrieben. Es bleibt allerdings unklar, ob die Aminosäuren frei gelöst im Axoplasma, oder in Organellen verpackt vorliegen. Koike und Nagata (1979) zeigten, daß ein Teil der im Axon vorhandenen Aminosäure in freigelöster Form vorliegt, nahmen aber an, daß nur der gebundene Teil transportiert wird.

Für Transmitter wie Noradrenalin und Serotonin wurde der axonale Transport in Speicherorganellen nachgewiesen (Dahlström, 1971; Goldberg et al., 1978). Ob dies auch für Aminosäuren gilt, ist nicht bekannt. Wegen der geringen Mengen an Leucin, die im Hechtrienerv transportiert werden, erschien es zur Klärung dieser Frage als nicht möglich, eine subzelluläre Fraktionierung von Nervhomogenaten durchzuführen.

Für eine Verpackung in Organellen sprechen Befunde von Carlson et al. (1984), die mit Hilfe von EM-autoradiographischen Methoden eine enge räumliche Beziehung von bestimmten Organellen ("dense core vesicles") mit von markierten Aminosäuren herrührenden Silberkörnern zeigen konnten.

Zudem wären durch die Annahme verschiedener Transportorganellen die hier gefundenen beiden unterschiedlichen Geschwindigkeiten von Aminosäuren im gleichen System am leichtesten zu erklären.

4.1.2 Abgrenzung des aktiven Transports von Diffusion

Inulin

Da Inulin nicht in Nervenzellen gelangt, spiegeln die erhaltenen Verteilungen von ^{14}C -Inulin entlang der Nerven die Diffusion von Inulin im Extrazellulärraum wieder. Aus diesen Verteilungen kann der effektive Diffusionskoeffizient (D) für Inulin berechnet werden. Es gilt (Gross et al., 1981):

$$\sigma^2 = 2Dt$$

wobei σ die Halbbreite der Verteilungskurve ist, gemessen an der Stelle $H/\sqrt{e}$ (Abb. 11).

Mit den aus den einzelnen Versuchen ermittelten Werten für σ ergibt sich ein Diffusionskoeffizient von

$$D = 0.25 \pm 0.14 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \quad (n = 6).$$

Im Gegensatz dazu beträgt der Diffusionskoeffizient für Inulin (MW = 5.5 kD) in Wasser $1.48 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Horowitz & Moore, 1974).

Aus dem Diffusionskoeffizient kann die Viskosität berechnet werden.
Für D gilt allgemein (Crank, 1956):

$$D = \frac{R T}{N_L} \cdot \frac{1}{6 \pi \eta r}$$

(R: allgemeine Gaskonstante T: absolute Temperatur
 N_L : Loschmidt'sche Zahl r: sphär. Molekülradius
 η : Viskosität)

Mit einem Molekülradius für Inulin von $r = 1.3 \text{ nm}$ (Mastro et al., 1984) ergibt sich für Inulin im Extrazellulärraum eine Viskosität, die im Bereich von 4 - 15 cP liegt.

Nicholson & Hounsgaard (1983) berichten, daß der Diffusionskoeffizient im Extrazellulärraum von Hirn-Schnitten ("cortex-slices") um den Faktor 3.4 geringer ist als im freien Medium, wobei zu berücksichtigen ist, daß der Extrazellulärraum in Hirn-Schnitten gegenüber dem intakten Hirn etwas vergrößert (d.h. erweitert) ist (Nicholson & Hounsgaard, 1983), was die Diffusion gegenüber der in vivo-Situation eher noch erleichtern sollte. Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß auch im Extrazellulärraum keine ungehinderte Diffusion möglich ist, so daß es plausibel erscheint, daß der berechnete Diffusionskoeffizient für Inulin im Extrazellulärraum in einem ähnlichen Bereich liegt, wie er nach Mikroinjektion im Inneren von Zellen bestimmt wurde (Horowitz & Moore, 1974; Mastro et al., 1984).

Leucin

Da im Fall von ^3H -Leucin nicht sicher entschieden werden kann, ob es intra- oder extrazellulär verteilt ist und auch nicht bekannt ist, ob das TCA-lösliche, d.h. nicht an Protein gebundene ^3H -Leucin, frei gelöst oder in Organellen verpackt vorliegt, ist nur eine grobe Abschätzung möglich, inwiefern Diffusion zu den gefundenen Verteilungen entlang der Nerven beitragen kann. Nimmt man eine Viskosität für Leucin (intra- und extrazellulär) von 5 cP an (s.a. Schmid, G. et al., 1983; Weiss et al., 1980), so ergibt sich daraus für frei gelöstes Leucin, das am schnell-

sten diffundieren würde, ein Diffusionskoeffizient von $1.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Mit diesem Wert lassen sich Verteilungen, wie sie sich nach Diffusion ergeben würden, errechnen. Die Diffusionsgleichung für Diffusion von einer örtlich ausgedehnten Quelle aus lautet in ihrer allgemeinen Form (Crank, 1956):

$$C = \frac{1}{2} C_0 \left(\operatorname{erf} \frac{h-x}{\sqrt{4Dt}} + \operatorname{erf} \frac{h+x}{\sqrt{4Dt}} \right)$$

C_0 ist die Ausgangskonzentration an diffundierender Substanz, die zur Zeit t_0 im Bereich $-h < x < h$ vorliegt. Da C_0 nicht bekannt ist, wird für die vorliegende Berechnung nur der Quotient C/C_0 berechnet. Die Diffusion von Leucin aus dem Nerv heraus wird vernachlässigt, da die Raten, mit der dieser Prozeß erfolgt, nicht bekannt ist und eine Berechnung unter Berücksichtigung von angenommenen Faktoren mathematisch äußerst komplex wäre. Diese Vernachlässigung erscheint für eine Abschätzung aber gerechtfertigt, da eine Diffusion aus dem Nerven heraus zu einer Abnahme der Gesamtmenge an diffundierendem Material führt; die Berücksichtigung dieser Abnahme hätte in der Berechnung eine langsamere Ausbreitung des Materials zur Folge.

Als h (cm) wird die Halbwertsbreite des Aktivitätspools, der experimentell nach Druckinjektion zur Zeit $t = 20 \text{ min}$ an der Injektionsstelle gefunden wurde, eingesetzt ($h = 0.08 \text{ cm}$). "erf" steht in obiger Gleichung für "error function" (= Gauß'sche Fehlerfunktion):

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt$$

Die Werte für diese Funktion sind tabelliert (Bronstein & Semendjajew, 1975). Abb. 43 zeigt im Vergleich eine berechnete Diffusionsverteilung ($t = 2h$) und eine experimentell gefundene Verteilung von TCA-löslicher Radioaktivität. Es ist zu sehen, daß auch eine rechnerische Abschätzung der Diffusion mit angenommenen Bedingungen, die die Diffusion eher überschätzen, ergibt, daß Diffusion nicht ausreicht, um

die experimentell gefundenen Verteilungen zu erklären.

Eine genaue experimentelle Bestimmung der intrazellulären Diffusionskoeffizienten und damit der Viskosität ist relativ schwierig und kann je nach Methode zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen (Wojcieszyn et al., 1982; Mastro et al., 1984). Beispielsweise können Bindungseffekte dazu führen, daß die apparenten Viskositätswerte für verschiedene Substanzen sehr stark voneinander abweichen. So wurden im Cytoplasma für Inulin eine Viskosität von 5.6 cP, für Albumin dagegen von 81 cP gefunden (Mastro et al., 1984).

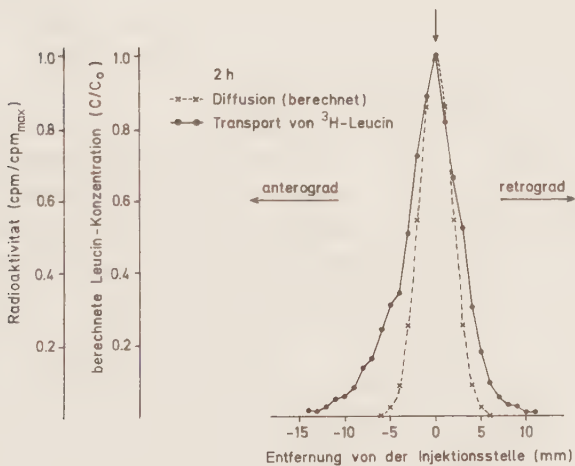


Abb. 43: Theoretische Verteilung von freiem Leucin durch Diffusion.

Der Vergleich von berechneter Diffusionsverteilung (s. Text) (x--x) und der experimentell gefundenen Verteilung von TCA-löslicher Radioaktivität 2 h nach Injektion von ^3H -Leucin in die Nervmitte (◆—◆) zeigt, daß auch eine rechnerische Abschätzung mit den angenommenen Bedingungen, die die Diffusion eher überschätzen, ergibt, daß Diffusion allein nicht ausreicht, um die experimentell gefundenen Verteilungen zu erklären.

Die in dieser Arbeit durchgeführte rechnerische Abschätzung der Rolle der Diffusion stellt ein Argument dar, um zu belegen, daß es sich bei der gefundenen Ausbreitung von ^3H -Leucin wirklich um einen aktiven Transport handelt. Diffusion konnte auch deswegen ausgeschlossen werden, da der Transport von ^3H -Leucin mit konstanter Geschwindigkeit erfolgt, während bei einer Ausbreitung durch Diffusion eine Abnahme der Geschwindigkeit mit zunehmender Entfernung vom Ausgangsort zu beobachten sein müßte. Außerdem kann das Auftreten von Gipfeln nicht durch Diffusion erklärt werden (Netter, 1959). Über diese Überlegungen hinaus konnte durch die Hemmung der Ausbreitung von ^3H -Leucin durch Colchizin auch experimentell sichergestellt werden, daß ein aktiver Transportprozeß vorliegt.

4.1.3 Transport von Carboxyfluoreszein

Die einige Stunden nach Injektion von Carboxyfluoreszeindiacetat (CFDA) gefundenen Verteilungen von Carboxyfluoreszein-Fluoreszenz entlang des Nerven lassen auf keinen aktiven Transport schließen. Da das fluoreszierende Carboxyfluoreszein (CF) erst nach Hydrolyse von CFDA im Inneren von Zellen entsteht, kann man annehmen, daß die gefundenen Verteilungen aus der intrazellulären Diffusion von CF resultieren. Wie für Inulin (s. 4.1.2) läßt sich daher der Diffusionskoeffizient errechnen. Er beträgt für CF $0.21 \pm 0.12 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Aus diesem Diffusionskoeffizient würde sich eine effektive Viskosität für CF in den Axonen von ca. 20 cP ergeben. Dieser relativ hohe Wert (s. z.B. Gross & Weiss, 1982) deutet an, daß CF im Hechtrienerv nicht oder nicht vollständig frei gelöst, sondern an (stationäre) Proteine gebunden ist. Dies steht in Einklang mit Befunden an kultivierten Nervenzellen, in denen mit Hilfe der FRAP-Technik (fluorescence recovery after photobleaching) für das sehr ähnliche Fluoreszein ein Diffusionskoeffizient gemessen wurde, der nahelegt, daß es nicht gelöst im Cytoplasma vorliegt, sondern möglicherweise reversibel von anderen Cytoplasmalelementen gebunden wird (Möncke, 1985; Wojcieszyn et al., 1982).

Das Ergebnis, daß CF nicht transportiert wird, steht im Gegensatz zu den Resultaten, die mit den in der Neuroanatomie verwendeten Fluores-

zenzfarbstoffen, auch nach Injektion in Nerven (Schmid, H. et al., 1983) erzielt wurden. Im Gegensatz zu diesen Farbstoffen, von denen aufgrund ihrer "granulären Verteilung" mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann, daß sie in Organellen verpackt transportiert werden, weisen CF und Fluoreszein eine homogene Verteilung in Zellen auf (Rotman & Papermaster, 1966; Möncke, 1985; Wade et al., 1986), d.h. es liegt entweder frei gelöst im Cytoplasma oder reversibel an Makromoleküle gebunden vor (s.o.). Dieser Unterschied stützt die Hypothese, daß eine Verpackung von Material in Organellen eine notwendige Voraussetzung für dessen Transport ist.

4.1.4 Physiologische Bedeutung des Transports niedermolekularer Substanzen

Die physiologische Bedeutung des bidirektionalen axonalen Transports von niedermolekularen Substanzen ist noch nicht sicher bekannt. In anterograder Richtung dient er möglicherweise dazu, die Axone mit kleinen Molekülen z.B. zur Modifikation von Proteinen (Ludueña, 1979; Chakraborty et al., 1986) zu versorgen und die Synapsen spezieller Neurone mit Aminosäuretransmittern zu beliefern (Goldman et al., 1976; Woodward, 1984). Für den retrograden Transport von niedermolekularen Substanzen werden, wie für den retrograden Transport allgemein, als mögliche Funktionen die Übermittlung trophischer Signale oder von Signalen nach Verletzung des Axons zum Zellkörper und der Abtransport "verbrauchter" Materialien aus der synaptischen Region diskutiert (Price et al., 1979; Bisby, 1982a).

Wie bereits erwähnt, werden in *Aplysia* Transmitter-Aminosäuren schneller als andere Aminosäuren transportiert (Price et al., 1979). Auch in Vertebraten werden bevorzugt Transmitter oder verwandte Moleküle transportiert, was zur Entwicklung der für die Neuroanatomie wichtigen Methode der "transmitter-spezifischen retrograden Markierung" genutzt wurde (Cuénod et al., 1982). Diese Spezifität beruht auf einer selektiven Aufnahme der transportierten Moleküle (Cuénod et al., 1982). Allerdings ist gefunden worden, daß an der Synapsenregion auch andere Aminosäuren aufgenommen und als freie Aminosäuren retrograd transportiert

werden (Kiss et al., 1981). Wie der gefundene bidirektionale Transport von Leucin im Hechtriechnerv zeigt, können auch von Axonen auch nicht transmitter-verwandte Aminosäuren aufgenommen und transportiert werden. Der Transmitter im olfaktorischen System beim Hecht ist, wie bei Fischen allgemein, noch nicht bekannt. Studien zum axonalen Transport von β -Alanin, der Vorstufe von Carnosin (β -alanyl-L-Histidin), ergaben keinen Hinweis darauf, daß dieses Peptid der Transmitter sein könnte (Weiss, 1982c), wohingegen es bei Säugern eine Reihe von Befunden für eine Transmitterfunktion von Carnosin im olfaktorischen System gibt (z. Übersicht s. Margolis, 1980).

4.2. Transport von Meerrettichperoxidase

Nach Injektion von Meerrettichperoxidase (HRP) in den Bulbus olfactorius zeigten die Verteilungen von HRP-Aktivität entlang der Nerven die typische Form von Transportprofilen. Die Profile ließen erkennen, daß es im Hechtriechnerv zwei Komponenten des axonalen Transports von HRP gibt: Ein kleiner Teil der injizierten HRP wird in einem schnellen Gipfel transportiert, dem der Hauptteil des Materials langsamer nachfolgt.

4.2.1 Abgrenzung von Diffusion

Die Bewegung beider Komponenten des Transports von HRP können klar von Diffusion unterschieden werden:

- Auch die Geschwindigkeit der langsameren Komponente ist deutlich schneller als die der Diffusion von HRP im Extrazellulärraum (Turner & Harris, 1974).
- Die Geschwindigkeiten sind konstant, was, wie oben ausgeführt, mit Diffusion unvereinbar ist.
- Es konnte für den retrograden Transport gezeigt werden, daß Colchizin die Bewegung beider Komponenten hemmt, was für einen aktiven Transport spricht.
- Im Riechnerv konnte HRP ausschließlich innerhalb von Organellen nachgewiesen werden (Seitz-Tutter, 1985); Diffusion von Organellen wäre

extrem langsam und könnte keinesfalls die beobachteten Geschwindigkeiten erklären.

4.2.2 Retrograder Transport von HRP

Die maximale Geschwindigkeit des retrograden axonalen Transports von HRP war 25 ± 4.3 mm/d (19°C). Mit dem Q_{10} -Wert von 2.44 für den anterograden Transport von Proteinen im Hechtrienerv (Gross & Kreutzberg, 1978) ergibt sich für den retrograden Transport von HRP rechnerisch eine Geschwindigkeit von 124 ± 21 mm/d bei 37°C . Dieser Wert liegt etwas über den meisten bisher vorliegenden Werten für HRP in warmblütigen Tieren. Für Säuger liegen diese Geschwindigkeiten im Bereich von 80 - 100 mm/d (z.Übersicht s. Bisby, 1980). Die in dieser Arbeit bestimmte Geschwindigkeit liegt aber beträchtlich höher als die bisher von Versuchen an poikilothermen Tieren erhaltenen Werte, die zwischen 2.5 und 12 mm/d (bei $18 - 20^{\circ}\text{C}$) liegen (Corvaja et al., 1977; Luiten, 1981). Der Grund für die höheren Werte für die Geschwindigkeit der schnellen Komponente liegt wahrscheinlich darin, daß die in dieser Arbeit bestimmten Werte aus Transportprofilen ermittelt wurden, und nicht aus histochemischen Experimenten, wo erst nach einer gewissen Zeit genügend Material akkumuliert, um sichtbar gemacht werden zu können. Die Mengen an HRP die im Gipfel transportiert werden, sind möglicherweise zu klein, um mit histochemischen Methoden nachgewiesen werden zu können (s.u.).

Die Geschwindigkeit der langsameren Komponente, die den Hauptteil des transportierten Materials mit sich führt, ist 7.4 ± 1.0 mm/d (19°C). Dieser Wert stimmt mit den oben erwähnten Geschwindigkeiten für den Transport von HRP in Fischen und Amphibien sehr gut überein. Der für eine Temperatur von 37°C berechnete Wert (36 mm/d) liegt etwas unter denen, die für den Transport in homoiothermen Tieren gefunden wurden, wo nur eine Komponente des HRP-Transports beschrieben wurde.

4.2.3 Anterograde Transport von HRP

Nach Injektion von HRP in die Mucosa konnte ein anterograde Transport gezeigt werden. Allerdings lagen die dafür erforderlichen Mengen über denen, die nötig waren um einen retrograden Transport nachzuweisen. Dies mag darauf zurückzuführen sein, daß die Mucosa sehr viel größer ist als der Bulbus und die Riechzellen über eine relativ große Fläche verteilt sind. Die für den anterograden Transport von HRP erhaltenen Transportprofile sind denen für den retrograden Transport sehr ähnlich. Auch die Mengen, die im schnell transportierten Gipfel und mit der Hauptmasse mitgeführt werden, entsprechen denen für den retrograden Transport. Die Geschwindigkeiten beider Komponenten sind nahezu identisch mit denen des retrograden Transports. Dies ist überraschend, da allgemein angenommen wird, daß HRP anterograd in Organellen transportiert wird, die vom Golgi-Apparat abgeleitet sind, während HRP retrograd in prälysosomalen Strukturen transportiert wird (Smith, 1980; Tsukita & Ishikawa, 1980).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Befunde stimmen überein mit den Befunden von Hanson (1973), der im Sehnerv gleiche Geschwindigkeiten für anterograden und retrograden Transport von HRP gefunden hat. Im Gegensatz dazu fanden Mesulam & Mufson (1980) für den anterograden Transport von HRP Geschwindigkeiten von 288 - 432 mm/d, die deutlich höher sind als die Geschwindigkeit des retrograden Transports. Diese Geschwindigkeiten liegen im Bereich von Geschwindigkeiten wie sie für den anterograden Transport von endogenen Proteinen gefunden wurden (Grafstein & Forman, 1980). Dagegen beträgt die gefundene Geschwindigkeit des anterograden Transports von HRP im Riechnerv des Hechts nur rund 1/5 der Geschwindigkeit von endogenen Proteinen (Gross & Kreutzberg, 1978).

4.2.4 Transportform

Mit EM-histochemischen Methoden konnte HRP in den Axonen des Riechnerven überwiegend in multivesikulären Organellen (multivesicular bodies, MVBs) nachgewiesen werden (Seitz-Tutter, 1985). Diese HRP-markierten MVBs, die zu den prälysosomalen Organellen gerechnet werden (Broadwell & Brightman, 1979; Tsukita & Ishikawa, 1980; Feher, 1984),

konnten 6 - 8 Stunden nach Injektion von HRP in einer Entfernung von 2 - 3 mm vom Bulbus gefunden werden (Seitz-Tutter, 1985). Die sich daraus ergebende Geschwindigkeit stimmt mit der gefundenen Geschwindigkeit für die Hauptmasse des transportierten Materials gut überein.

Die Transportform von HRP im schnellen Gipfel konnte dagegen nicht histochemisch analysiert werden (Seitz-Tutter, 1985). Trotzdem kann man annehmen, daß der retrograde axonale Transport von HRP im schnellen Gipfel in membranumgebenen Organellen erfolgt. So spricht die schnelle Geschwindigkeit für eine "Verpackung" von HRP in Organellen, da die Geschwindigkeiten, die man für lösliche Proteine gefunden hat, erheblich langsamer sind, als die von Organellen (Grafstein & Forman, 1980; Weiss, 1982b). Es liegt daher nahe, anzunehmen, daß die gefundenen zwei Geschwindigkeiten des axonalen Transports von HRP die Verpackung des gleichen Materials in verschiedene Organellen widerspiegelt. Ähnliches nehmen auch Ohlson et al. (1985) für ein anderes exogenes Protein, ein Lektin des Pilzes *Aleuria aurantia* an, für das sie im optischen System ebenfalls zwei verschiedene Transportgeschwindigkeiten (in anterograder Richtung) gefunden hatten.

4.3 Transport von endogenen Proteinen

4.3.1 Methode der in vivo kovalenten Markierung von Proteinen

Die in vivo kovalente Markierung ist die einzige Methode zur Untersuchung des retrograden axonalen Transports von endogenen Proteinen, die den großen Vorteil hat, daß sie nicht von einer de novo Synthese von Proteinen in den Zellkörpern abhängig ist (Fink & Gainer, 1980a,b; Gainer & Fink, 1982). Bei den sonst üblichen Methoden der Untersuchung von distal an einer Ligatur akkumulierten Proteinen, mußte alles Material über den Umweg des anterograden Transports und nachfolgender Umkehr an den Nervenendigungen oder an einer Ligatur markiert werden. Dadurch sind immer auch markierte Proteine im Axon vorhanden, die vom anterograden Transport angeliefert und auf dem Weg zur Synapse im Axon "abgeladen" worden sind. Außerdem ist das Anbringen einer Ligatur immer

ein erheblicher Eingriff in die normale Physiologie der Nervenzelle. Demgegenüber wird bei Anwendung der in vivo kovalenten Markierung die Physiologie des Neurons und der Transport der markierten Proteine nicht merklich beeinträchtigt (Fink & Gainer, 1980a; Gainer & Fink, 1982). Die Markierung der Proteine erfolgt unspezifisch, d.h., die einzelnen Proteine werden annähernd entsprechend ihrer Konzentration markiert (s. Abb. 19)(Gainer & Fink, 1982).

Ein Problem bei der in vivo kovalenten Markierung stellt die geringe Menge an markiertem Material dar, das transportiert wird; der ganz überwiegende Teil des markierten Materials bleibt auf einen engen Bereich um die Injektionsstelle beschränkt. Es sind daher immer relativ große Mengen an Radioaktivität nötig, um einen Transport von markierten Proteinen nachweisen und die Zusammensetzung der Proteine untersuchen zu können.

4.3.2 Kovalente Markierung nach Injektion in die Mucosa und in die Nervmitte

Auf die erwähnte geringe Effektivität der Markierung transportierter Proteine kann es zurückzuführen sein, daß in dieser Arbeit nach Injektion von ^3H -NSP in die Mucosa kein anterograde Transport gefunden werden konnte. Möglicherweise war die verwendete Menge an Markierungssubstanz (200 μCi) noch zu klein, um einen Transport nachweisen zu können.

Im Fall der Injektion in die Mucosa ergab sich das zusätzliche Problem, daß im Gegensatz zum Bulbus offenbar nicht alle Proteine entsprechend ihrer Konzentration markiert wurden (s. Abb. 15). Eine mögliche Erklärung ist, daß aufgrund der Größe der Mucosa das injizierte ^3H -NSP nicht völlig gleichmäßig über die gesamte Mucosa verteilt war und aufgrund des relativ schnellen Ablaufs der Markierungsreaktion (Fink & Gainer, 1980a) nicht alle Proteine von der Markierungssubstanz erreicht wurden.

Nach Injektion von ^3H -NSP in die Nervmitte war kein schneller Transport, weder in anterograde noch in retrograde Richtung nachweisbar (s. 3.3.2), was wiederum auf die möglicherweise zu geringen Mengen an

markierten transportierbaren Proteinen zurückzuführen ist. Fink & Gainer (1980a,b) berichteten nach Injektion in den N. ischiadicus nur von einem langsamen retrograden Transport. Lediglich durch Analyse der nach längerer Transportdauer (24h - 7d) im Spinalganglion akkumulierten Proteine konnte ein schneller retrograder Transport nachgewiesen und die transportierten Proteine mit SDS-Gelelektrophorese und Fluorographie charakterisiert werden (Fink et al., 1985). Dieses Vorgehen ist bei Verwendung des olfaktorischen Systems des Hechts nicht möglich. Zur Injektion von Substanzen in die Nervmitte muß der Nerv ein Stück freigelegt werden, was eine nicht wieder verschließbare Operationsöffnung zur Folge hat. Da das Tier deshalb während der gesamten Transportdauer in Narkose gehalten und die Tiefe der Narkose laufend kontrolliert werden mußte, waren Versuche mit Transportzeiten länger als 12h nicht durchführbar. Aus diesem Grund wäre es mit der verwendeten Methode auch nicht möglich, die (außerhalb des Themas dieser Arbeit liegende) Frage zu klären, ob es im Hechtrienerv eine langsame Komponente des retrograden Transports gibt.

4.3.3 Retrograder Transport von kovalent markierten endogenen Proteinen

Transportgeschwindigkeit

Nach Injektion von ^3H -NSP in den Bulbus olfactorius konnte ein retrograder Transport von radioaktiv markierten, endogenen Proteinen nachgewiesen werden. Die maximale Geschwindigkeit mit der dieser Transport erfolgt, beträgt 27 mm/d (19°C), was mit einem Q_{10} -Wert von 2.44 (Gross & Kreutzberg, 1978) rechnerisch eine Geschwindigkeit von 134 mm/d bei 37°C ergibt. Diese Geschwindigkeit entspricht der gefundenen maximalen Geschwindigkeit des exogenen Proteins Meerrettichperoxidase (s.3.2), ist aber beträchtlich langsamer als der anterograde Transport von endogenen Proteinen, für die ein Wert von 150 mm/d (19°C) ermittelt wurde (Gross & Kreutzberg, 1978).

Für den retrograden Transport von endogenen Proteinen werden Werte für die Geschwindigkeit berichtet, die sich über einen weiten Bereich erstrecken (z. Übersicht s. Bisby, 1980), wobei aber generell die Geschwindigkeiten für den retrograden axonalen Transport langsamer sind

und zwischen 1/5 und 1/2 der Werte des anterograden Transports betragen (z.B. Bisby & Buchan, 1981; z. Übersicht s. Bisby, 1980; Grafstein & Forman, 1980). So finden z.B. Couraud et al (1985) für den Transport von Acetylcholinesterase im Ischiasnerv des Frosches Geschwindigkeiten von 100 - 120 mm/d in anterograder und 20 - 30 mm/d (20°C) in retrograder Richtung.

Mit der Methode der kovalenten Markierung wurden bisher nur wenige grobe Abschätzungen der Geschwindigkeit des schnellen retrograden Transports berichtet. Neben einer langsamen Komponente des retrograden Transports mit einer Geschwindigkeit von 3 - 5 mm/d (37°C) (Fink & Gainer, 1980a,b; Mata et al., 1985), geben Mata et al. (1985) eine maximale Geschwindigkeit von größer als 160 mm/d (37°C) an. In einer vorläufigen Untersuchung ermittelten McLean & Meiri (1981) zwei Geschwindigkeiten (96 und 182 mm/d bei 37°C), was ein Hinweis auf das Vorliegen von mehreren Transportraten neben dem langsamen Transport sein könnte. Bisher waren multiple Transportraten nur vom anterograden Transport bekannt, wo die mit verschiedenen Geschwindigkeiten transportierten Proteine in 2 - 3 mehr oder weniger genau definierbare Gruppen (des schnellen Transports) eingeteilt wurden (vgl. Tabelle I; Skene & Willard, 1981; Baitinger et al., 1982; Szaro et al., 1984).

Art der transportierten Proteine

Nach Injektion von ^3H -NSP in den Bulbus konnte nicht nur ein retrograder Transport von markierten endogenen Proteinen nachgewiesen werden, sondern es gelang auch, diese Proteine mit SDS-Gelelektrophorese zu charakterisieren. Die gefundene Verschiedenheit von Gesamtproteinmuster und Radioaktivitätsmuster in den einzelnen Nervstücken ist ein sehr starker Hinweis darauf, daß die in den Nervstücken gefundenen radioaktiv markierten Proteine dorthin transportiert worden sind, und nicht lokal nach Diffusion oder Transport von ^3H -NSP markiert worden sind. Diese Möglichkeit ist zwar nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen, ist aber sehr unwahrscheinlich, wenn man noch zusätzlich berücksichtigt, daß die Muster der radioaktiv markierten Proteine in den einzelnen Nervstücken - bei gleichem Gesamtproteinmuster - untereinander verschieden sind.

Die Muster der radioaktiv markierten Proteine zeigten, daß eine ganze Reihe von endogenen Proteinen retrograd transportiert wird. Nach 2D-Gelelektrophorese war ein komplexes Muster transportierter Proteine zu erkennen. Sie besitzen durchweg ein relativ kleines Molekulargewicht (< 60 kD). Da das Proteinmuster deutlich Proteine mit höherem Molekulargewicht erkennen läßt, ist mit einiger Sicherheit auszuschließen, daß die relativ niedermolekularen transportierten Proteine durch Protease-tätigkeit während der Aufarbeitung entstanden sind.

Auch in anderen Studien, in denen die kovalente Markierung angewendet wurde, wurden als endogene, retrograd transportierte Proteine v.a. solche mit relativ kleinem Molekulargewicht gefunden (Fink et al., 1985; Williams & Agranoff, 1983). Der Befund, daß die Muster der radioaktiv markierten Proteine in den einzelnen Nervstücken unterschiedlich war, stimmt mit Beobachtungen von Williams & Agranoff (1983) überein, und legt nahe, daß mehrere Geschwindigkeiten des schnellen retrograden Transports existieren, bzw. daß verschiedene endogene Proteine mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten retrograd transportiert werden. Die Identität der retrograd transportierten Proteine ist ebenso wie die der anterograd transportierten Proteine noch weitgehend unbekannt.

Der Vergleich des Transports von endogenen Proteinen in retrograder und anterograder Richtung ergab bei Akkumulationsversuchen eine weitgehende Ähnlichkeit der Muster der transportierten Proteine (Abe et al., 1974; Bisby, 1981). Diese Ähnlichkeit kann möglicherweise dadurch zustande kommen, daß nur Proteine mit kurzer Verweildauer an den Synapsen erfaßt werden. Diese Versuche belegen daher in erster Linie, daß die Umkehr von schnell transportierten Proteinen an den Nervenendigungen und an einer Ligatur ein unspezifischer Prozeß ist.

Dagegen ergab ein Vergleich der in dieser Arbeit charakterisierten, retrograd transportierten Proteine mit den anterograd transportierten Proteinen im Riechnerv des Hechts, starke Unterschiede: während, wie oben ausgeführt, die retrograd transportierten Proteine durchweg ein relativ niedriges Molekulargewicht besitzen, werden anterograd, nach Markierung über die Applikation einer radioaktiv markierten Aminosäure, vor allem Proteine mit hohem Molekulargewicht (> 100 kD) transportiert (Weiss et al., 1978; Hawlitschek, 1984). Auch im sehr ähnlichen System des Riechnervs des Knochenhechts wurde gefunden, daß v.a. Proteine mit

relativ hohem Molekulargewicht anterograd transportiert werden (Cancalon et al., 1976).

In wieweit die unterschiedliche Art der Markierungsmethode einen Einfluß hat auf die Muster der markierten Proteine, konnte nicht entschieden werden, da mit der kovalenten Markierungsmethode kein anterograder Transport nachgewiesen werden konnte. Allerdings spricht der Befund von Williams & Agranoff (1983), daß sich nach Injektion von ^3H -NSP in den Sehnerv, im Tectum opticum und in der Retina verschiedene Proteine akkumulieren, stark dafür, daß die in dieser Arbeit gefundenen Unterschiede zwischen den anterograd und retrograd transportierten Proteinen nicht auf die verschiedenen Markierungsmethoden zurückzuführen sind.

4.4 Transport von Organellen

4.4.1. AVEC-DIC Mikroskopie

Die fortschreitende Entwicklung der Videomikroskopie hat zu einer wesentlichen Verbesserung der Beobachtungsmöglichkeiten in der Zellbiologie allgemein und insbesondere der intrazellulären Motilität geführt (Allen et al., 1981a,b; Inoue, 1981; Walter & Berns, 1981; Allen & Allen, 1983; Inoue, 1986). So hat es erst der Einsatz von elektronisch regelbaren Videokameras ermöglicht, die Methode des differentiellen Interferenzkontrasts nach Nomarski in größerem Umfang zur Beobachtung von Bewegungsvorgängen in Zellen zu verwenden. Diese Methode ist zwar neben der Dunkelfeldmikroskopie die lichtmikroskopische Methode mit der höchsten Detektierfähigkeit, aber die Bilder sind bei herkömmlicher Verwendung (Einstellung bei hoher Extinktion, s. 2.5.2) relativ dunkel, so daß für photographische Aufzeichnung lange Belichtungszeiten nötig sind (Snyder & Smith, 1984). Bei Verwendung von regelbaren Videokameras kann dagegen im Bereich geringerer Extinktion gearbeitet werden. Bei dieser Einstellung ist das Bild insgesamt sehr viel heller (für das Auge zur Wahrnehmung von Kontrasten zu hell) und der Kontrast stark erhöht (s. 2.5.2).

In Verbindung mit digitaler Bildverarbeitung lassen die Methoden der Videomikroskopie Beobachtungen von einer Qualität zu, wie sie mit herkömmlichen lichtmikroskopischen Techniken nicht vorstellbar sind. Bei der Interpretation der mit modernen videomikroskopischen Methoden wie der AVEC-DIC Mikroskopie erzielten Aufnahmen ist allerdings zu beachten, daß submikroskopische Strukturen wie z.B. Mikrotubuli lediglich detektiert werden können, die apparente Größe der dargestellten Strukturen aber keine Aussagen über ihre wirkliche Größe zuläßt (Allen et al., 1981a; Allen & Allen, 1983; Allen, 1985).

Mit Hilfe der AVEC-DIC Mikroskopie gelang erstmals die Beobachtung des anterograden Transports von kleinen Vesikeln mit 50 nm Durchmesser (Allen et al., 1982; Brady et al., 1982), des bidirektionalen Transports von Organellen entlang einzelner Mikrotubuli (Hayden et al., 1983; Allen et al., 1985a; Schnapp et al., 1985; Vale et al., 1985a) und das Gleiten von Mikrotubuli-Stücken entlang von Glasoberflächen (Allen et al., 1985a; Vale et al., 1985b).

Daß in der vorliegenden Arbeit der Transport von sehr kleinen Vesikeln nicht beobachtet werden konnte, kann mehrere Gründe haben. Zum einen sind die Bewegungen dieser kleinen Vesikel fast nur in Zeitrafferaufnahmen zu beobachten (Allen et al., 1982; Brady et al., 1982). Da kein Videorekorder mit Zeitraffereinrichtung zur Verfügung stand, konnte nicht entschieden werden, ob ein anterograder Transport von kleinen Vesikeln im Hechtriechnerv, wie er in manchen Präparaten vielleicht zu erahnen sein könnte, vorhanden ist. Weiter ist es möglich, daß der benützte Videomikroskopie-Aufbau nicht ganz an das Optimum herankam (Gulden, 1985). Eine Beobachtung der kleinen Vesikel gelingt nur bei wirklich optimalem apparativem Aufbau und in einem geeigneten Präparat. Die Bewegung der anterograd transportierten kleinen Vesikel ist bisher nur im Riesenaxon des Tintenfischs beobachtet worden (Allen et al., 1982; Brady et al., 1982; Brady et al., 1985), und es ist möglich, daß die präparierten Axonbündel des Hechtriechnerven nicht die optischen Voraussetzungen erfüllen, die nötig sind, um diese Vesikel zu beobachten.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Intervall-Subtraktion zur digitalen Verarbeitung des Videobildes kann nicht zusätzliche Partikel, die durch das optische System und die Anwendung von Kontrastver-

stärkenden Methoden nicht dargestellt werden, sichtbar machen. Die Intervall-Subtraktion verbessert aber die Detektierbarkeit deutlich, indem mit ihr ein strukturierter, aber stationärer Hintergrund subtrahiert wird, in dem viele Organellen der Beobachtung entgehen würden. Dadurch vervielfacht sich die Zahl der beobachtbaren Organellen in einer mit Intervall-Subtraktion aufgenommenen Sequenz gegenüber einer Sequenz, in der nur der Kontrast verstärkt wurde.

4.4.2 Art und Geschwindigkeit der transportierten Organellen

Art der Organellen

Da mit lichtmikroskopischen Methoden Organellen, die hinsichtlich ihrer Biochemie verschieden sind, nur dann zu unterscheiden sind, wenn sie sich auch in ihrer Geometrie und/oder ihrem Brechungsindex unterscheiden (Snyder & Smith, 1984), ergeben sich v.a. bei der Identifizierung runder Organellen große Schwierigkeiten (z.B. Young & Hart, 1986). In vielen Untersuchungen beschränkte man sich daher darauf, runde Organellen als "Partikel" zu bezeichnen (z.B. Cooper & Smith, 1974). Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Bezeichnung "lysosomenähnliche Organellen" (lysosome like organelles, LLOs), ist zumindest für die retrograd transportierten runden Organellen mit großer Wahrscheinlichkeit zutreffend, da aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen bekannt ist, daß in retrograder Richtung v.a. Lysosomen und Organellen, die als prälysosomale Strukturen angesehen werden, transportiert werden (Smith, 1980; Tsukita & Ishikawa, 1980). Die genaue Natur der beobachteten, anterograd transportierten Organellen bleibt unklar; da sie aber einen ähnlich hohen Kontrast wie die retrograd transportierten Organellen aufweisen, ist es unwahrscheinlich, daß es sich um kleine Vesikel oder Organellen des tubulovesikulären System handelt, die in elektronenmikroskopischen Untersuchungen den überwiegenden Anteil der anterograd transportierten Organellen bilden (Smith, 1980; Tsukita & Ishikawa, 1980). Neben diesen Organellen wurden aber auch (allerdings nur wenige) lysosomale Strukturen ("dense lamellar bodies") gefunden, die anterograd transportiert wurden (Smith, 1980; Smith, 1982).

Bei der zweiten Klasse von Organellen, deren Transport beobachtet werden konnte, den länglichen Organellen, handelt es sich aufgrund ihres Erscheinungsbilds mit großer Wahrscheinlichkeit um Mitochondrien (Cooper & Smith, 1974; Forman et al., 1977; Smith, 1982). In kultivierten Neuroblastomzellen ist darüber hinaus durch spezifische Anfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Rhodamin 123) nachgewiesen worden, daß es sich bei länglichen Organellen, die den im Hechtrienerv beobachteten sehr ähnlich sind, um Mitochondrien handelt (Möncke, 1985).

Daß im Gegensatz zu anderen Arbeiten, in denen berichtet wurde, daß sich nur wenige Mitochondrien bewegen (Cooper & Smith, 1974; Forman et al., 1977), in dieser Arbeit die Anzahl der in beiden Richtungen transportierten Mitochondrien relativ hoch war, ist unter Umständen auf die verwendete Methode der Intervall-Subtraktion zurückzuführen, die bewegte Objekte vor einem strukturiertem Hintergrund wesentlich besser erkennen läßt (s.o.).

Transportgeschwindigkeit

Die Geschwindigkeit mit der die Organellen im Hechtrienerv transportiert werden, liegt allgemein betrachtet in einem Bereich, der auch in Gewebekulturzellen (Breuer et al., 1975; Leestma & Freeman, 1977; Takenaka et al., 1985), myelinisierten Axonen des Ischiasnerven von Amphibien (Cooper & Smith, 1974; Forman et al., 1977; Koles et al., 1982b) und Riesenaxonen von Invertebraten (Adams, 1982; Forman et al., 1983a, Gulden, 1985) gefunden wurde.

Die ermittelte Geschwindigkeit der LLOs im Hechtrienerv ist für anterograde und retrograde Richtung gleich. Dieser Befund steht in Einklang mit mehreren Arbeiten an anderen Systemen (Leestma & Freeman, 1977; Koles et al., 1982b; Takenaka et al., 1985). Dagegen wurde in anderen Arbeiten gefunden, daß die Geschwindigkeit der anterograd transportierten Organellen/Partikel deutlich schneller (Cooper & Smith, 1974), oder deutlich langsamer (Forman et al., 1983a) als die der retrograd transportierten ist. Ob diese unterschiedlichen Ergebnisse methodische Gründe haben, wie Leestma & Freeman (1977) vermuten, oder ob in einigen Systemen die Geschwindigkeiten der Organellen in die verschiedenen Richtungen wirklich unterschiedlich sind, ist nicht geklärt. Für die erste Möglichkeit spricht, daß in vielen Arbeiten die Anzahl der beob-

achteten Partikel in anterograder Richtung klein ist (Smith, 1982) und sich dadurch leicht Fehler bei einer Auswahl von auszuwertenden Partikeln ergeben (Leestma & Freeman, 1977). Für methodische Ursachen der berichteten Unterschiede zwischen den Geschwindigkeiten von anterogradem und retrogradem Transport von Partikeln spricht auch, daß eine Arbeitsgruppe in einer (früheren) Arbeit unterschiedliche Geschwindigkeiten für die beiden Richtungen findet (Cooper & Smith, 1974) und in einer späteren Arbeit am gleichen System (Axone des N. ischiadicus von *Xenopus*) gleiche mittlere Geschwindigkeiten für die beiden Richtungen berichtet (Koles et al., 1982b).

Für die Transportgeschwindigkeit von Mitochondrien liegen in der Literatur sehr viel weniger Daten vor als für die runden Organellen/Partikel. Dabei wird, in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit am Hecht-riechsnerv gefundenen Werten, eine langsamere Geschwindigkeit der in anterograder Richtung transportierten Mitochondrien berichtet (Allen et al., 1982; Forman et al., 1983a; Forman et al., 1984). Dieser Unterschied in der Geschwindigkeit läßt sich nicht auf unterschiedliche Längen der in die verschiedenen Richtungen transportierten Mitochondrien zurückführen, wie auch keine Korrelation zwischen der Länge der Mitochondrien und ihrer jeweiligen Geschwindigkeit gefunden wurde. Zusätzlich ist die Anzahl der in beide Richtungen transportierten Mitochondrien annähernd gleich. Da aber nicht viel mehr Mitochondrien zum Zellkörper zurücktransportiert werden können, als ihn mit dem anterograden Transport verlassen haben, muß man annehmen, daß die schnelleren, retrograd transportierten Mitochondrien öfter oder länger stehen bleiben als die anterograd transportierten.

Ein Vergleich der gefundenen Geschwindigkeiten der Organellenbewegung mit den Geschwindigkeiten aus den biochemischen Versuchen ist sehr schwierig, da es sich bei ersteren um Daten handelt, die an einzelnen Organellen gewonnen wurden, während bei den biochemischen Versuchen die Geschwindigkeiten von (Organellen-)Populationen bestimmt wurden. Außerdem ist es eine wesentliche Beschränkung aller lichtmikroskopischen Techniken, daß Organellen nur über eine im Vergleich zur Gesamtlänge des Axons sehr kurze Strecke beobachtet werden können (Snyder & Smith, 1984) und daher über die Anzahl und Dauer der Pausen eines Organells während seines Transports über eine lange Strecke keine Aussage möglich ist.

So kann lediglich die Feststellung getroffen werden, daß die gefundene Geschwindigkeit zumindest eines Teils der Organellen, auch wenn Pausen eingelegt werden, schnell genug ist, um auch die Maximalgeschwindigkeit des schnellen anterograden Transports von Proteinen und niedermolekularen Substanzen im Riechnerv des Hechts von 150 mm/d (Gross & Kreutzberg, 1978; Weiss, 1982c; Schmid, G. et al., 1983) erklären zu können ($2 \mu\text{m/s} = 172.8 \text{ mm/d}$).

4.4.3 Hemmstoffe der Organellenbewegung

Das Mitosegift Colchizin ist, seitdem Kreutzberg (1969) dessen hemmende Wirkung auf den anterograden axonalen Transport nachgewiesen hatte, einer der meistverwendeten Hemmstoffe bei der Untersuchung des axonalen Transports, bzw. bei der Abgrenzung des axonalen Transports von Diffusionsprozessen (s.a. 4.1.2 u. 4.2.1; Hanson & Edström, 1978). Im Fall des Organellentransports im Hechtriechnerv wurde gefunden, daß Colchizin den Transport sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung irreversibel hemmt. Dieser Befund ist ein weiterer Beleg dafür, daß auch der retrograde Transport Mikrotubuli-assoziiert ist. Zur Hemmung des Organellentransports war, wie auch Hammond & Smith (1977) für isolierte Axone des N. ischiadicus von *Xenopus* fanden, eine Colchizin-Konzentration von 0.1 mM ausreichend. Diese Konzentration ist wesentlich geringer als die, die bei den biochemischen Experimenten am Hechtriechnerv verwendet wurde (10 mM), da bei diesen Experimenten eine völlig andere Situation vorlag: Die Nerven waren zwar freigelegt, verblieben aber in situ, während bei den Versuchen zur Organellenbewegung der Transport in einem isolierten, dünnen Bündel von Axonen beobachtet wurde, dem zudem das Perineurium fehlte, das als Diffusionsbarriere wirkt (Weerasuriya et al., 1980).

Von Triethyl-Blei (TriEL) ist bekannt, daß es in Grünalgen die Chromosomenbewegung und die Cytokinese hemmt (Röderer, 1984a,b) und sowohl in vitro als auch in Zellkulturzellen zur Depolimerisation von Mikrotubuli führt (Röderer & Dönges, 1983; Zimmermann et al., 1985). Die lichtmikroskopische Beobachtung der Wirkung von TriEL auf den Organellentransport im Riechnerv des Hechts zeigte eine irreversible Hemmung

des Transports in beide Richtungen bei einer Konzentration von 7.5 und 10 μM . Bei diesen Konzentrationen traten aber auch deutliche Veränderungen der Struktur der beobachteten Axonbündel auf, so daß die Hemmung möglicherweise keine spezifische Hemmung des axonalen Transports war, sondern zumindest teilweise auf die ebenfalls vorhandene membranolytische Eigenschaft des TriEL (Röderer, 1985) zurückzuführen war. Ob bei den niedrigeren verwendeten Konzentrationen (1 und 5 μM) eine möglicherweise sehr langsam (nach Stunden) einsetzende Hemmung des Transports von Organellen vorhanden war, konnte nicht entschieden werden.

Das ATP-Analogon erythro-9[3-(2-Hydroxynonyl)]adenine (EHNA) ist als Hemmstoff dyneinartiger ATPasen beschrieben worden (Bouchard et al., 1981; Penningroth et al., 1982). Forman et al. (1983b) fanden bei einer Untersuchung des Organellentransports in Hummer-Riesenaxonen, daß EHNA selektiv den retrograden Transport hemmt. Dieser Befund konnte am Hecht-riechernerv nicht bestätigt werden. Hier hemmt EHNA den Transport in beide Richtungen. Diese Hemmung betrifft sowohl die Anzahl der bewegten Organellen als auch deren Geschwindigkeit, und ist weitgehend reversibel.

Da in Riesenaxonen des Tintenfischs ebenfalls eine Hemmung des Organellentransports in beiden Richtungen berichtet wurde (Brady et al., 1985), Versuche mit radioaktiven Markierungsmethoden eine Hemmung des anterograden Transports durch EHNA ergaben (Goldberg, 1982; Ekström & Kanje, 1984), und auch Forman seine Behauptung nicht mehr aufrecht erhält (Forman, 1986), kann zusammenfassend festgestellt werden, daß bis jetzt kein Hemmstoff bekannt ist, von dem eindeutig feststeht, daß er spezifisch den axonalen Transport in nur einer Richtung beeinflusst.

Da inzwischen gefunden wurde, daß EHNA auch nicht-dyneinartige ATPasen hemmt (Schliwa et al., 1984), kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht geschlossen werden, daß Dynein oder dyneinartige ATPasen am molekularen Mechanismus des axonalen Transports beteiligt sind.

4.4.4 Mögliche Transportmechanismen

Der genaue molekulare Mechanismus des axonalen Transports ist weiterhin noch nicht bekannt, doch erbrachten Befunde, die in jüngster Zeit am Tintenfisch erzielt wurden, in dieser Hinsicht wesentliche

Fortschritte. Diese Ergebnisse sollen in diesem Zusammenhang kurz diskutiert werden.

Mit AVEC-DIC Mikroskopie konnte die Bewegung von Organellen entlang einzelner Mikrotubuli und die von Mikrotubuli selbst, direkt beobachtet werden (Allen et al., 1985a; Brady et al., 1985; Vale et al., 1985a,b; Schnapp et al., 1985). Es konnte gezeigt werden, daß die Bewegungen der Organellen und der Mikrotubuli eng korreliert sind, so daß angenommen werden kann, daß die Bewegungen von Organellen und Mikrotubuli auf einen molekularen Mechanismus zurückzuführen sind (Allen et al., 1985a; Weiss, 1986).

Mit elektronenmikroskopischen Methoden konnten besonders in Axonregionen, in denen der Transport durch Kühlung blockiert war, Querbrücken zwischen Mikrotubuli und Organellen nachgewiesen werden (Fahim et al., 1985; Miller & Lasek, 1985). Diese Befunde sprechen stark für eine Krafterzeugung des Transportmechanismus durch spezifische Interaktionen. Zusätzlich unterstützt wird diese Sicht durch den Nachweis, daß ein nichthydrolysierbares ATP-Analogon (Adenylyl-imidodiphosphat; AMP-PNP) Organellen an Mikrotubuli bindet (Lasek & Brady, 1985; Langford et al., 1986). Man kann dies als Situation ähnlich des Rigors bei der Muskelkontraktion interpretieren (Weiss, 1986). Unter Ausnutzung der Bindung von Organellen an Mikrotubuli durch AMP-PNP konnte ein Protein gereinigt werden, das in vitro Organellen- und Mikrotubulibewegungen hervorruft (Vale et al., 1985c). Dieses "Kinesin" genannte Protein ist löslich oder an Organellen gebunden (Vale et al., 1985c). Da es aber nur sehr geringe ATPase Aktivität besitzt (Vale et al., 1985c), ist noch nicht endgültig sicher, ob es ein krafterzeugendes Enzym darstellt. Speziell das Gleiten und die schlangenartigen Bewegungen von Mikrotubuli (Allen et al., 1985a) sprechen dagegen, daß die krafterzeugenden Enzyme nur löslich oder an Organellen gebunden sind, und favorisieren eher Modelle, die zumindest zeitweise eine festere Bindung der krafterzeugenden Enzyme an Mikrotubuli als Möglichkeit beinhalten (Allen et al., 1985b; Weiss & Allen, 1985).

Durch diese in jüngster Zeit erzielten Ergebnisse konnten einige der früher vorgeschlagenen Erklärungen des Transportmechanismus ausgeschlossen werden. Mikrotubuli-"treadmilling" (Margolis & Wilson, 1981), das mikrotrabekuläre Netzwerk (Porter et al., 1979; Ellisman, 1982), das

endoplasmatische Retikulum (Rambourg & Droz, 1980), Aktin (z.B. Isenberg et al., 1980) und Neurofilamente sind an der Krafterzeugung beim axonalen Transport sehr wahrscheinlich nicht beteiligt (Weiss, 1986; Weiss & Allen, 1985).

Die Bewegung von Mikrotubuli ist zwar von der Mikrostromhypothese vorausgesagt worden (Weiss & Gross, 1982; Weiss & Gross, 1983), aber der Nachweis von Querbrücken zwischen Organellen und Mikrotubuli führte dazu, daß die Krafterzeugung durch Mikroströme heute nicht mehr als gegeben betrachtet wird (Weiss & Allen, 1985). Mikroströme können aber durch hydrodynamische Effekte entstehen, wenn zahlreiche Organellen an Mikrotubuli entlangbewegt werden (Weiss & Gross, 1982). Solche sekundären Mikroströme werden vorgeschlagen, um experimentelle Befunde, die nicht oder nur schwer mit Querbrücken-Modellen zu beschreiben sind, zu erklären (Weiss & Allen, 1985).

Gegenwärtig erscheint es als sehr schwierig, die neuen in vitro - Befunde in die in vivo Situation, d.h. in das Axon "zurückzutransformieren" (Weiss et al., 1986b) und Modelle zu entwerfen, die die Bidirektionalität des Transports erklären können. Dabei muß berücksichtigt werden, daß alle Mikrotubuli in Axonen die gleiche Polarität haben (Burton & Paige, 1981) und Organellen trotzdem entlang eines Mikrotubulus in beide Richtungen transportiert werden können (Hayden et al., 1983; Allen et al., 1985a; Schnapp et al., 1985; Vale et al., 1985a).

4.4.5 Feinanalyse der Organellenbewegung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte keine erschöpfende Analyse der Feindynamik der Bewegung aller Organellenklassen durchgeführt werden, sondern im Hinblick auf den Vergleich von anterogradem und retrogradem Transport untersucht werden, ob Unterschiede in der Feindynamik von in verschiedenen Richtungen transportierten Organellen auftreten. Dazu wurden für beide Richtungen ähnlich große, kontrastreiche Organellen ausgewählt, deren Positionskoordinaten automatisch aufgenommen werden konnten. Der Vergleich der Feindynamik bezieht sich daher nur auf eine Subpopulation von relativ kontrastreichen, runden Organellen.

Methode der computergestützten Bewegungsanalyse

Mit der in 2.5.6 und von Keller (1986) beschriebenen Methode werden die Ortskoordinaten der Organellen von Videobändern in einen Rechner übernommen, gespeichert und später ausgewertet. Die zeitliche Auflösung ist prinzipiell nur durch die Videofrequenz (50 Hz) beschränkt und liegt damit wesentlich über der, die mit Filmaufnahmen möglich ist (3 - 5 Hz)(Koles et al., 1982b). Je höher die Frequenz der Datenaufnahme ist, um so mehr Feinheiten der Bewegung können analysiert werden. In jedem Fall muß sie mindestens doppelt so hoch sein wie die höchste Frequenz im Originalsignal, um bei einer Frequenzanalyse gravierende Fehler ("aliasing") zu vermeiden (Snyder & Smith, 1984; Keller, 1986). Die aus praktischen Gründen gewählte Frequenz von 25 Hz liegt weit über der von Snyder & Smith (1984) als nötig erachteten Frequenz (3 Hz) und ist sicher ausreichend, um das kontinuierliche Signal adaequat zu rekonstruieren. Eine geringe Limitierung der Methode stellt gegenwärtig noch die Länge der Datensätze dar. Durch die Verwendung eines Personalcomputers mußte, um für die weiteren Berechnungen noch vernünftige Rechenzeiten einhalten zu können, die Länge auf 512 Koordinatenpaare beschränkt werden. Dies erlaubt bei einer Datenaufnahme mit 25 Hz die Analyse der Bewegung eines Organells über einen Zeitraum von maximal 20,48 Sekunden. Dies reichte aber für die Untersuchungen am Hechtriechnerv für die ganz überwiegende Zahl der Organellen aus.

Die räumliche Auflösung der Methode beträgt 512 x 512 Bildschirmpunkte (Pixel). Bei einer Vergrößerung bei der die Bildschirmbreite einer Strecke von rund 25 μm entspricht, beträgt die Pixelfläche rund 0,05 x 0,05 μm . Diese Auflösung reicht sicher nicht aus, um etwa vorhandene molekulare Interaktionen, wie z.B. einen durch einen einzelnen Zyklus eines krafterzeugenden Enzyms verursachten Sprung eines Organells, direkt widerzuspiegeln. Die computergestützte Analyse von Organellenbewegungen kann aber sehr gut dazu benützt werden, durch quantitative Bestimmung von verschiedenen Parametern der Bewegung, wie in dieser Arbeit die Bewegungen von Organellen in verschiedene Richtungen, oder den Organellentransport in verschiedenen neuronalen und nichtneuronalen Zellen zu vergleichen (Weiss et al., 1986a).

Ergebnisse der Feinanalyse

Das Hauptergebnis der in dieser Arbeit durchgeführten Feinanalyse ist, daß sich keine wesentlichen Unterschiede der Feindynamik der Bewegungen von anterograd und retrograd transportierten Organellen erkennen lassen. So zeigen die Organellen beispielsweise in beiden Richtungen nur geringe Abweichungen von der Hauptbewegungsrichtung. Die Amplitudenspektren zeigen für beide Richtungen nur niedrige Frequenzen, d.h. es fehlen höherfrequente Bewegungsanteile. Dennoch zeigen die Momentangeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Zeit relativ schnelle Geschwindigkeitssprünge, die wahrscheinlich zu der Bezeichnung der tierischen Zellorganellen-Bewegung als "saltatorische Bewegung" geführt haben (Rebhun, 1972; Cooper & Smith, 1974; Forman et al., 1977; Koles et al., 1982b). Diese Geschwindigkeitssprünge erfolgen für keine der beiden Richtung mit irgendeiner erkennbaren Regelmäßigkeit. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Forman et al. (1977) überein, die bei einer Feinanalyse der Organellenbewegung in Axonen des N. ischiadicus von Amphibien keinerlei Regelmäßigkeiten wie gequantelte Geschwindigkeiten, gequantelte Längen der Sprünge oder periodische Änderungen in der Geschwindigkeit gefunden hatten. Die Geschwindigkeitssprünge sind wahrscheinlich auf lokale Eigenschaften des Axoplasmas zurückzuführen oder, mit anderen Worten, die Geschwindigkeit eines Organells ist mit abhängig von den Eigenschaften des Axoplasmas, durch das es sich bewegt (Koles et al., 1982b). Lynn et al. (1986) zeigten, daß anterograd und retrograd transportierte Organellen gemeinsame Wege ("tracks") benutzen können, und daß in diesem Fall die Organellen an gleichen Positionen ähnliche Geschwindigkeitsänderungen zeigen. Große Geschwindigkeitssprünge, d.h. hohe kurze Beschleunigungen, könnten möglicherweise durch elastische Prozesse noch unbekannter Art hervorgerufen werden.

4.5 Vergleich von anterogradem und retrogradem Transport

Die vergleichende Untersuchung der Dynamik von anterogradem und retrogradem Transport im Riechnerv des Hechts ergab sehr viele Übereinstimmungen und Ähnlichkeiten (s. Tabelle II). Obwohl kein direkter Beweis möglich war, so muß doch angenommen werden, daß auch in den

extrem dünnen Fasern des Hechtrienervs ein Transport auch großer Organellen in anterograder und retrograder Richtung in einem Axon gleichzeitig erfolgt. Dies ist angesichts der Tatsache, daß z.B. ein Mitochondrium nahezu den gleichen Durchmesser wie ein Axon hat, nicht leicht vorstellbar.

Alternative Erklärungsmöglichkeiten sind allerdings äußerst unwahrscheinlich. Eine Möglichkeit wäre, daß einige Axone nur einen anterograden Transport, und andere nur einen retrograden Transport besitzen. Dies würde aber z.B. einen massiven Stoffaustausch zwischen Axonen an den synaptischen Endigungen erfordern, wofür es keinerlei Evidenzen gibt. Außerdem spricht eine wenn auch kurze Richtungsumkehr von Organellen, wie sie beobachtet wurde, stark gegen diese Vorstellung. Eine zweite Möglichkeit wäre, daß die Transportrichtungen in einem Axon zeitweise alternieren. Dies würde aber eine sehr komplizierte Regulation erfordern; zudem erlaubt diese Möglichkeit nicht die kontinuierliche Versorgung der Synapsen.

Ein sehr starker Hinweis darauf, daß anterograder und retrograder Transport in einem dieser engen Axone gleichzeitig stattfinden können, sind elektronenmikroskopische Aufnahmen, die in einem Quer- oder Längsschnitt eines Axons zwei Mitochondrien zeigen (Seitz-Tutter, 1985). Aus diesen Aufnahmen kann zwar nicht entschieden werden, ob beide Mitochondrien in Bewegung waren, oder ob sie sich in gleicher oder entgegengesetzter Richtung bewegten, aber sie zeigen, daß es möglich ist, daß zwei Mitochondrien nebeneinander in einem Axon Platz finden. Dies erfordert, daß sich die Plasmamembran ganz erheblich erweitert. Sie ist dazu ganz offensichtlich auch in situ, ebenso wie in kultivierten Nervenzellen (Koenig et al., 1985), in der Lage. Man muß daher annehmen, daß, wenn ein Organell während seiner Bewegung auf Widerstand stößt und gebremst wird, dieser Widerstand nicht durch die Plasmamembran, sondern durch Bestandteile des Axoplasmas verursacht wird.

Von den in dieser Arbeit erhobenen Befunden ausgehend, läßt sich unter Berücksichtigung auch der früheren Arbeiten am Hechtrienerv (Gross & Kreutzberg, 1978; Weiss et al., 1978; Weiss, 1982c; Schmid, G. et al., 1983), der bidirektionale Transport in diesem System in einem teilweise noch hypothetischen Gesamtbild beschreiben, mit dem die verschiedenen gefundenen Geschwindigkeiten erklärt werden können.

Danach werden die am schnellsten transportierten endogenen Proteine und wahrscheinlich auch die niedermolekularen Substanzen im Zellkörper in kleine Vesikel verpackt und in retrograder Richtung abtransportiert. Es dürfte sich dabei um die "axoplasmatischen Vesikel" handeln, die auch von Allen et al. (1982) im Riesenaxon des Tintenfischs gesehen wurden, im Hechtrienerv allerdings nicht beobachtet werden konnten. Diese Organellen werden nicht retrograd transportiert und können nach Injektion von Markierungssubstanzen in die Nervmitte diese anscheinend nicht, oder nicht in nachweisbarem Umfang aufnehmen.

Daneben werden mit dem anterograden Transport auch andere Organellen mitgeführt, die z.B. das Transportkompartiment für HRP bilden und z.T. auch "unterwegs", d.h. beispielsweise nach Injektion niedermolekularer Substanzen in die Nervmitte, markiert werden können. Diese Organellen dürften größer als die oben erwähnten Vesikel sein und zu mehreren biochemisch verschiedenen Organellentypen gehören. Sie werden - möglicherweise aufgrund ihrer Größe - mit einer geringeren Geschwindigkeit transportiert.

Ebenfalls größere und langsamere Organellen könnten die Transportkompartimente für den retrograden Transport von endogenen Proteinen und auch exogenem Material wie z.B. HRP bilden. Zumindest ein Teil der retrograd transportierten Organellen kann nach Injektion in die Nervmitte markiert werden.

Die im Vergleich zum anterograden Transport langsamere Geschwindigkeit der retrograd transportierten endogenen Proteine kann darauf zurückzuführen sein, daß die kleinen "axoplasmatischen Vesikel" wie oben angeführt, nicht retrograd transportiert werden. Unterschiedliche Geschwindigkeiten von verschiedenen oder gleichen Substanzen können demnach durch Verpackung in unterschiedliche Organellen erklärt werden; die Annahme verschiedener Mechanismen zur Erklärung verschiedener Geschwindigkeiten ist nicht erforderlich. Da bei allen bisher bekannten Hemmstoffen der gesamte Transportprozeß betroffen ist, ist es unwahrscheinlich, daß einzelne Komponenten oder Gruppen, wie sie z.B. von Skene & Willard (1981) oder Tytell et al. (1981) für den anterograden Transport berichtet wurden, auf die Wirkung mehrerer verschiedener Mechanismen zurückzuführen sind.

Die in dieser Arbeit gefundene große Ähnlichkeit zwischen anterogradem und retrogradem Transport unterstützt die Ansicht, daß die Mechanismen, d.h. die krafterzeugenden Enzyme für anterograden und retrograden Transport wenn vielleicht auch nicht identisch, so doch sehr ähnlich sind. Vale et al. (1985d) berichten zwar von Hinweisen auf zwei verschiedene Translokator-Proteine, konnten aber das Protein, das für die retrograde Richtung verantwortlich sein soll, nicht näher charakterisieren. Miller & Lasek (1985) konnten morphologisch keine Unterschiede zwischen den Querbrücken zwischen den Mikrotubuli und anterograd bzw. retrograd transportierten Organellen erkennen. Außerdem spricht die Tatsache, daß es bisher nicht überzeugend gelungen ist, anterograden oder retrograden Transport selektiv zu hemmen, stark gegen zwei verschiedene Mechanismen. Denkbar wäre allenfalls das Vorhandensein von 2 Translokatoren, die sich sehr ähnlich sind und sich nur in Bindungs- und/oder Erkennungssequenzen für die Organellen für die jeweilige Richtung unterscheiden.

Eine zweite Möglichkeit für das Zustandekommen des Transports in entgegengesetzte Richtungen ist, daß nur ein krafterzeugendes Enzym existiert, das einen elliptischen Schlag ausführen und eine Kraft in beide Richtungen ausüben kann (Allen et al., 1985b). Hierbei ist allerdings nicht geklärt, inwieweit eine Kraftausübung in der Art möglich ist, daß die Bereiche, in denen sich anterograd und retrograd transportierte Organellen bewegen, genügend getrennt sind, so daß sie nicht ständig kollidieren.

Literatur

- Abe, T., Haga, T. & Kurokawa, M. (1974): Retrograde axoplasmic transport: Its continuation as anterograde transport.
FEBS Lett. 47:272-275
- Adams, R.J. (1982): Organelle movement in axons depend on ATP.
Nature 297:327-329
- Allen, R.D. (1985): New observations on cell architecture and dynamics by video-enhanced contrast optical microscopy.
Ann.Rev.Biophys. 14:265-290
- Allen, R.D. & Allen, N.S. (1983): Video enhanced microscopy with a computer frame memory. J.Microscopy 129:3-17
- Allen, R.D., Allen, N.S. & Travis, J.L. (1981a): Video-enhanced contrast, differential interference contrast (AVEC-DIC) microscopy: A new method capable of analyzing microtubule-related motility in the reticulopodial network of *Allogromia laticollaris*.
Cell Motility 1:291-302
- Allen, R.D., Travis, J.L., Allen, N.S. & Yilmaz, H. (1981b): Video-enhanced contrast polarization (AVEC-POL) microscopy: A new method applied to the detection of birefringence in the motile reticulopodial network of *Allogromia laticollaris*. Cell Motil. 1:275-288
- Allen, R.D., Metuzals, J., Tasaki, I., Brady, S.T. & Gilbert, S.P. (1982): Fast axonal transport in squid giant axon.
Science 218:1127-1129
- Allen, R.D., Weiss, D.G., Hayden, J.H., Brown, D.T., Fujiwake, H. & Simpson, M. (1985a): Gliding movement of and bidirectional organelle transport along single native microtubules from squid axoplasm: Evidence for an active role of microtubules in cytoplasmic transport. J.Cell Biol. 100:1736-1752
- Allen, R.D., Weiss, D.G., Seitz-Tutter, D. & Simpson, M. (1985b): The dynamic microtubule theory of axonal and cytoplasmic transport, and a hypothesis regarding the mechanism. In: Microtubules and Microtubules Inhibitors 1985 (DeBrabander, M & DeMey, J. eds.), Elsevier, North Holland, Amsterdam, pp. 225-232
- Aschoff, A., Fritz, N. & Illert, M. (1982): Axonal transport of fluorescent compounds in the brain and spinal cord of cat and rat. In: Axoplasmic Transport in Physiology and Pathology (Weiss, D.G. & Gorio, A. eds.) Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 177-187
- Baitinger, C., Levine, J., Lorenz, T., Simon, C., Skene, P. & Willard, M. (1982): Characteristics of axonally transported proteins. In: Axoplasmic Transport (Weiss, D.G. ed.) Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 110-120

- Bisby, M.A. (1980): Retrograde axonal transport. In: *Advances in Cellular Neurobiology Vol.I* (Fedoroff, S. & Hertz, L. eds.), Academic Press, London, New York, pp. 69-117
- Bisby, M.A. (1981): Reversal of axonal transport: Similarity of proteins transported in anterograde and retrograde directions. *J.Neurochem.* 36:741-745
- Bisby, M.A. (1982a): Functions of retrograde axonal transport. *Fed.Proc.* 41:2307-2311
- Bisby, M.A. (1982b): Ligature techniques. In: *Axoplasmic Transport* (Weiss, D.G. ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 437-441
- Bisby, M.A. (1983): Velocity of axonal transport of labeled protein is not dependent on local concentration. *Exp.Neurol.* 79:168-175
- Bisby, M.A. (1984): Retrograde axonal transport and nerve regeneration. In: *Axonal Transport in Neuronal Growth and Regeneration* (Elam, J.S. & Cancalon, P. eds.), Plenum Press, New York, pp.45-67
- Bisby, M.A. & Buchan, D.H. (1981): Velocity of labeled protein undergoing anterograde and retrograde axonal transport. *Exp.Neurol.* 74:11-20
- Bonath, K. (1977): *Narkose der Reptilien, Amphibien und Fische*. Parey Verlag, Berlin, Hamburg
- Bouchard, P., Penningroth, S.M., Cheung, A., Gagnon, C. & Bardin, C.W. (1981): Erythro-9[3-(2-hydroxynonyl)]adenine is an inhibitor of sperm motility that blocks dynein ATPase and protein carboxyl-methylase activities. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78:1033-1036
- Bove, F.J. (1966): MS-222 SANDOZ. Das Anaestheticum und Sedativum für Fische, Frösche und andere Kaltblüter. Sandoz AG, Basel
- Brady, S.T., Lasek, R.J. & Allen, R.D. (1982): Fast axonal transport in extruded axoplasm from squid giant axon. *Science* 218:1129-1131
- Brady, S.T., Lasek, R.J. & Allen, R.D. (1985): Video microscopy of fast axonal transport in extruded axoplasm: A new model for study of molecular mechanisms. *Cell Motility* 5:81-101
- Breer, H. & Rahmann, H. (1974): Axonal transport of ^3H -glucose radioactivity in the optic system of *Scardinius erythrophthalmus*. *J.Neurochem.* 22:245-250
- Breuer, A.C., Christian, C.N., Henkart, M. & Nelson, P.G. (1975): Computer analysis of organelle translocation in primary neuronal cultures and continuous cell lines. *J.Cell Biol.* 65:562-576

- Brimijoin, S., Dyck, P.J., Jakobsen, J. & Lambert, E.H. (1982): Axonal transport in human nerve disease and in the experimental neuropathy induced by p-bromophenylacetylurea. In: *Axoplasmic Transport in Physiology and Pathology*. (Weiss, D.G. & Gorio, A. eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp.124-130
- Broadwell, R.D. & Brightman, M.W. (1979): Cytochemistry of undamaged neurons transporting exogenous proteins in vivo. *J.Comp.Neurol.* 185:31-74
- Bronstein, J.N. & Semendjajew, K.A. (1975): *Taschenbuch der Mathematik*. (15. Aufl.), Verlag Harri Deutsch, Frankfurt
- Buchner, K. (1983): Anterograder und retrograder axonaler Transport von exogenen Proteinen im Riechnerv des Hechts (*Esox lucius* L.). Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Buchner, K., Gulden, J. & Weiss, D.G. (1984): Bidirectional cytoplasmic transport of organelles in olfactory nerve axons: An AVEC-DIC study. In: *International Cell Biology 1984-1985* (Seno, S. & Okada, Y. eds.), Academic Press Japan, Tokyo p. 491
- Burton, P.R. & Paige, J.L. (1981): Polarity of axoplasmic microtubules in the olfactory nerve of the frog. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78:3269-3273
- Canalón, P., Elam, J.S. & Beidler, L.M. (1976): SDS gel electrophoresis of rapidly transported proteins in garfish olfactory nerve. *J.Neurochem.* 27:687-693
- Carlson, K.E., Price, C.H. & Aizenman, E. (1984): Selective retrograde axonal transport of free glycine in identified neurons of *Aplysia*. *Cell.Mol.Neurobiol.* 4:231-247
- Chakraborty, G., Leach, T., Zanakis, M.F. & Ingoglia, N.A. (1986): Posttranslational protein modification by amino acid addition in regenerating optic nerves of goldfish. *J.Neurochem.* 46:726-732
- Cooper, P.D. & Smith, R.S. (1974): The movement of optically detectable organelles in myelinated axons of *Xenopus laevis*. *J.Physiol.(Lond.)* 242:77-97
- Corvaja, N., D'Ascanio, P., Merli, M. & Zucconi, C. (1977): Slow rate transport of horseradish peroxidase in toads. *Brain Res.* 128:537-541
- Couraud, J.Y., Nicolet, M. & Hässig, R. (1985): Rapid axonal transport of three molecular forms of acetylcholinesterase in frog sciatic nerve. *Neurosci.* 14:1141-1147
- Cowan, W.M. & Cuénod, M. (1975): *The Use of Axonal Transport for Studies of Neuronal Connectivity*. Elsevier, Amsterdam
- Crank, J. (1956): *The Mathematics of Diffusion*. Oxford University Press, London

- Csanyi, V., Gervai, J. & Lajtha, A. (1973): Axoplasmic transport of free amino acids. *Brain Res.* 56:271-284
- Cuénod, M., Bagnoli, P., Beaudet, A., Rustioni, A., Wiklund, L. & Streit, P. (1982): Transmitter-specific retrograde labeling of neurons. In: *Cytochemical Methods in Neuroanatomy* (Palay, S.L. & Chan-Palay, V. eds.), Alan Liss, New York, pp. 17-44
- Dahlström, A. (1971): Axoplasmic transport (with particular respect to adrenergic neurons). *Phil.Trans.R.Soc.London Ser.B.* 261:325-358
- Droz, B. (1975): Synthetic machinery and axoplasmic transport: Maintenance of neuronal connectivity. In: *The Nervous System Vol.1: The Basic Neurosciences* (Tower, D.B. ed.), Raven Press, New York, pp. 111-127
- Droz, B., Rambourg, A. & Koenig, H.L. (1975): The smooth endoplasmic reticulum: structure and role in the renewal of axonal membrane and synaptic vesicles by fast axonal transport. *Brain Res.* 93:1-13
- Dumas, M., Schwab, M.E. & Thoenen, H. (1979): Retrograde axonal transport of specific macromolecules as a tool for characterizing nerve terminal membranes. *J.Neurobiol.* 10:179-197
- Edwards, S.B. & Hendrickson, A. (1981): The autoradiographic tracing of axonal connections in the central nervous system. In: *Neuroanatomical Tract-Tracing Methods.* (Heimer, L. & Robards, M.J. eds.), Plenum Press, New York, pp. 171-206
- Ekström, P. & Kanje, M. (1984): Inhibition of fast axonal transport by erythro-9-[3(2-hydroxynonyl)]adenine. *J.Neurochem.* 43:1342-1345
- Ellisman, M.H. (1982): A hypothesis for rapid axoplasmic transport based upon focal interactions between axonal membrane systems and the microtrabecular crossbridges of the axoplasmic matrix. In: *Axoplasmic Transport* (Weiss, D.G. ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 390-396
- Fahim, M.A., Lasek, R., Brady, S.T. & Hodge, A.J. (1985): AVEC-DIC and electron microscopic analyses of axonally transported particles in cold-blocked squid giant axons. *J.Neurocytol.* 14:689-704
- Feher, E. (1984): Electron microscopic study of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Int.Rev.Cytol.* 90:1-29
- Fink, D.J. & Gainer, H. (1980a): Axonal transport of proteins. A new view using in vivo covalent labeling. *J.Cell Biol.* 85:175-186
- Fink, D.J. & Gainer, H. (1980b): Retrograde axonal transport of endogenous proteins in sciatic nerve demonstrated by covalent labeling in vivo. *Science* 208:303-305
- Fink, D.J., Purkiss, D. & Mata, M. (1985): Rapid retrograde transport of proteins in sensory neurons in rats. *Brain Res.* 345:394-397

- Forman, D.S. (1982): Microscopic methods for the observation of axonal transport in living axons. In: *Axoplasmic Transport* (Weiss, D.G. ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 424-428
- Forman, D.S. (1986): Axonal transport of mitochondria. In: *Axonal Transport* (Smith, R.S. ed.), Alan Liss, New York, in press
- Forman, D.S., Padjen, A.L. & Siggins, G.R. (1977): Axonal transport of organelles visualized by light microscopy: Cinematographic and computer analysis. *Brain Res.* 136:197-213
- Forman, D.S., Brown, K.J. & Livengood, D.R. (1983a): Fast axonal transport in permeabilized lobster giant axons is inhibited by vanadate. *J.Neurosci.* 3:1279-1288
- Forman, D.S., Brown, K.J. & Prommersberger, M.E. (1983b): Selective inhibition of retrograde axonal transport by erythro-9-[3-(2-hydroxy-nonyl)]adenine. *Brain Res.* 272:194-197
- Forman, D.S., Smith, R.S. & Lynch, K.J. (1984): Axonal transport of mitochondria in giant axons of the lobster. *Soc.Neurosci.Abstr.* 10:356
- Frizell, M. & Sjöstrand, J. (1974): Retrograde axonal transport of rapidly migrating proteins in the vagus and hypoglossal nerves of the rabbit. *J.Neurochem.* 23:651-657
- Gainer, H. & Fink, D.J. (1982): Covalent labeling techniques and axonal transport. In: *Axoplasmic Transport* (Weiss, D.G. ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 464-470
- Gold, B.G., Griffin, J.W. & Trapp, B.D. (1984): Lack of evidence for slow retrograde transport in nerve using the Bolton Hunter reagent. *Soc.Neurosci.Abstr.* 10:353
- Goldberg, D.J. (1982): Microinjection into an identified axon to study the mechanism of fast axonal transport. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79:4818-4822
- Goldberg, D.J., Schwartz, J.H. & Sherbany, A.A. (1978): Kinetic properties of normal and perturbed axonal transport of serotonin in a single identified axon. *J.Physiol.(Lond.)* 281:559-579
- Goldman, J.E., Kim, K.S. & Schwartz, J.H. (1976): Axonal transport of (³H)serotonin in an identified neuron of *Aplysia californica*. *J.Physiol.(Lond.)* 242:61-76
- Gonatas, N.K., Harper, C., Mizutani, T. & Gonatas, J.O. (1979): Superior sensitivity of conjugates of horseradish peroxidase with wheat germ agglutinin for studies of retrograde axonal transport. *J.Histochem.Cytochem.* 27:728-734

- Goodall, H. & Johnson, M.H. (1982): Use of carboxyfluorescein diacetate to study formation of permeable channels between mouse blastomeres. *Nature* 295:524-526
- Grafstein, B. & Forman, D.S. (1980): Intracellular transport in neurons. *Physiol.Rev.* 60:1167-1283
- Gross, G.W. (1975): The microstream concept of axoplasmic and dendritic transport. *Adv.Neurol.* 12:283-296
- Gross, G.W. & Beidler, L.M. (1975): A quantitative analysis of isotope distribution profiles and rapid transport velocities in the c-fibers of the garfish olfactory nerve. *J.Neurobiol.* 6:213-233
- Gross, G.W. & Kreutzberg, G.W. (1978): Rapid axoplasmic transport in the olfactory nerve of the pike: I.Basic transport parameters for proteins and amino acids. *Brain Res.* 139:65-76
- Gross, G.W. & Weiss, D.G. (1982): Theoretical considerations on rapid transport in low viscosity regions. In: *Axoplasmic Transport* (Weiss, D.G. ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 330-341
- Gross, G.W., Stewart, G.H. & Horwitz, B. (1981): Molecular diffusion cannot account for spreading of isotope distribution peaks during rapid axoplasmic transport. *Brain Res.* 216:215-218
- Gulden, J. (1985): Die AVEC-DIC Mikroskopie und ihre Anwendung zur Detektion kleinster Strukturen und zur Analyse des axonalen Transports in Riesenaxonen des Flußkrebsees *Astacus astacus*. Diplomarbeit, Technische Universität München
- Hammond, G. & Smith, R.S. (1977): Inhibition of the rapid movement of optically detectable axonal particles by colchicine and vinblastine. *Brain Res.* 128:227-242
- Hanson, M. & Edström, A. (1978): Mitosis inhibitors and axonal transport. *Int.Rev.Cytol.* Suppl.7:373-402
- Hansson, H.A. (1973): Uptake and intracellular bidirectional transport of horseradish peroxidase in retinal ganglion cells. *Exp.Eye Res.* 16:377-388
- Hawlitsek, G. (1984): Schneller axonaler Transport löslicher und partikulärer Proteine. Diplomarbeit Ludwig-Maximilians-Universität München
- Hayden, J.H. & Allen, R.D. (1984): Detection of single microtubules in living cells: Particle transport can occur in both directions along the same microtubule. *J.Cell Biol.* 99:1785-1793
- Hayden, J.H., Allen, R.D. & Goldman, R.D. (1983): Cytoplasmic transport in keratocytes: Direct visualization of particle translocation along microtubules. *Cell Motility* 3:1-19

- Heimer, L. & Robards, M.J. (1981): Neuroanatomical Tract-Tracing Methods. Plenum Press, New York
- Hesselmann, N. (1983): Digitale Signalverarbeitung. Vogel Verlag, Würzburg
- Horowitz, S.B. & Moore, L.C. (1974): The nuclear permeability, intracellular distribution, and diffusion of inulin in the amphibian oocyte. *J.Cell Biol.* 60:405-415
- Ingoglia, N.A., Sturman, J.A., Lindquist, T.D. & Gaull, G.E. (1976): Axonal migration of taurine in the goldfish visual system. *Brain Res.* 115:535-539
- Ingoglia, N.A., Sturman, J.A. & Eisner, R.A. (1977): Axonal transport of putrescine, spermidine and spermine in normal and regenerating goldfish optic nerves. *Brain Res.* 130:433-445
- Inoue, S. (1981): Video image processing greatly enhances contrast, quality, and speed in polarization-based microscopy. *J.Cell Biol.* 89:346-356
- Inoue, S. (1986): Video Microscopy. Plenum Press, New York
- Isenberg, G., Schubert, P. & Kreutzberg, G.W. (1980): Experimental approach to test the role of actin in axonal transport. *Brain Res.* 194:588-593
- Karlsson, J.O. (1977): Is there an axonal transport of amino acids? *J.Neurochem.* 29:615-617
- Keller, F. (1986): Computergestützte Analyse von Organellenbewegung in Zellen dargestellt an den Axopodien von *Raphidiophrys ambigua* und *Echinospaerium nucleofilum*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Keller, F., Gulden, J. & Weiss, D.G. (1985): Fine analysis of fast organelle transport in crayfish giant axons by AVEC-DIC microscopy: A study using digital filtering and FFT. *Eur.J.Cell Biol.* 36(Suppl.)7:33
- Kiss, J., Mezey, E. & Palkovits, M. (1981): Axonterminal uptake and retrograde axonal transport of labeled amino acids and their incorporation into proteins of neuronal perikarya. *Neurosci.* 6:2035-2046
- Koenig, E., Kinsman, S., Repansky, E. & Sultz, L. (1985): Rapid mobility of motile varicosities and inclusions containing α -spectrin, actin, and calmodulin in regenerating axons in vitro. *J.Neurosci.* 5:715-729
- Koike, H. & Nagata, Y. (1979): Intra-axonal diffusion of ^3H -acetylcholine and ^3H - γ -aminobutyric acid in a neuron of *Aplysia*. *J.Physiol.(Lond.)* 295:397-417

- Koles, Z.J., McLeod, K.D. & Smith, R.S. (1982a): The determination of the instantaneous velocity of axonally transported organelles from filmed records of their motion. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 60:670-679
- Koles, Z.J., McLeod, K.D. & Smith, R.S. (1982b): A study of the motion of organelles which undergo retrograde and anterograde rapid axonal transport in *Xenopus*. *J.Physiol.(Lond.)* 328:469-484
- Kreutzberg, G.W. (1969): Neuronal dynamics and axonal flow. IV. Blockade of intra-axonal enzyme transport by colchicine. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 62:722-728
- Kreutzberg, G.W. & Gross, G.W. (1977): General morphology and axonal ultrastructure of the olfactory nerve of the pike, *Esox lucius*. *Cell Tiss.Res.* 181:443-457
- Kristensson, K. (1982): Implications of axoplasmic transport for the spread of virus infections in the nervous system. In: *Axoplasmic Transport in Physiology and Pathology* (Weiss, D.G. & Gorio, A. eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 153-158
- LaVail, J. (1978): A review of the retrograde transport technique. In: *Neuroanatomical Research Techniques* (Robertson, R.T. ed.), Academic Press, New York, pp. 355-384
- LaVail, J.H. & LaVail, M.M. (1974): The retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system: A light and electron microscopic study. *J.Comp.Neurol.* 157:303-358
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lajtha, A. (1975): Transport and incorporation of amino acids in relation to measurement of axonal flow. In: *The use of axonal transport for studies of neuronal connectivity* (Cowan, W.M. & Cuénod, M. eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 26-45
- Langford, G.M., Allen, R.D. & Weiss, D.G. (1986): Substructure of side-arms on squid axoplasmic vesicles and microtubules visualized by negative contrast electron microscopy. *Cell Motil.Cytoskel.* 6: in press
- Lasek, R.J. & Brady, S.T. (1985): Attachment of transported vesicles to microtubules in axoplasm is facilitated by AMP-PNP. *Nature* 316:645-647
- Leestma, J.E. & Freeman, S.S. (1977): Computer-assisted analysis of particulate axoplasmic flow in organized CNS tissue cultures. *J.Neurobiol.* 8:453-467
- Litchy, W.J. (1973): Uptake and retrograde transport of horseradish peroxidase in frog sartorius nerve in vitro. *Brain Res.* 56:377-381

- Litchy, W.J. & Brimijoin, S. (1982): Concentration-dependence of the velocity of rapid axonal transport in adrenergic fibers of the bullfrog. In: Axoplasmic Transport (Weiss, D.G. ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 260-266
- Ludueña, R.F. (1979): Biochemistry of tubulin. In: Microtubules (Roberts, K. & Hyams, J.S. eds.), Academic Press, London, pp. 65-116
- Luiten, P.G.M. (1981): Afferent and efferent connections of the optic tectum in the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Brain Res.* 220:51-65
- Lundqvist, I. & Josefsson, J.O. (1971): Sensitive method for determination of peroxidase activity in tissue by means of coupled oxidation reaction. *Anal.Biochem.* 41:567-577
- Lynn, M.P., Atkinson, M.B. & Breuer, A.C. (1986): Influence of translocation track on the motion of intra-axonally transported organelles in human nerve. *Cell Motil.Cytoskel.* 6:339-346
- Margolis, F.L. (1980): Carnosine: An olfactory neuropeptide. In: Role of Peptides in Neuronal Function (Barker, J.L. & Smith, T. eds.), Marcel Dekker, New York, pp. 545-572
- Margolis, R.L. & Wilson, L. (1981): Microtubule treadmills - possible molecular machinery. *Nature* 293:705-711
- Mastro, A.M., Babich, M.A., Taylor, W.D. & Keith, A.D. (1984): Diffusion of a small molecule in the cytoplasm of mammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81:3414-3418
- Mata, M., Staple, J. & Fink, D.J. (1985): Ultrastructural localization of slow retrograde axonal transport: An autoradiographic study. *J.Neurosci.* 5:2900-2908
- McLean, G. (1984): Neurotoxicity and axonal transport. *TIPS* 5:243-246
- McLean, W.G. & Meiri, K.F. (1981): Two rapid rates of retrograde axonal transport of protein radiolabeled with N-succinimidyl propionate in rat sciatic nerve. *J.Physiol.(Lond.)* 317:82P
- Mesulam, M.M. (1982): Principles of horseradish peroxidase neurohistochemistry and their applications for tracing neural pathways - axonal transport, enzyme histochemistry and light microscopic analysis. In: Tracing Neural Connections with Horseradish Peroxidase (Mesulam, M.M. ed.), J.Wiley, Chichester, New York, pp. 1-151
- Mesulam, M.M. & Mufson, E.J. (1980): The rapid anterograde transport of horseradish peroxidase. *Neurosci.* 5:1277-1286
- Miller, R.H. & Lasek, R.J. (1985): Cross-bridges mediate anterograde and retrograde vesicle transport along microtubules in squid axoplasm. *J.Cell Biol.* 101:2181-2193

- Möncke, E. (1985): Videomikroskopische Untersuchungen zu Verteilung und Transport von Fluoreszenzfarbstoffen in kultivierten Nervenzellen. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Muñoz-Martínez, E.J., Nuñez, R. & Sanderson, A. (1981): Axonal transport: A quantitative study of retained and transported protein fraction in the cat. *J.Neurobiol.* 12:15-26
- Nagatsu, I., Kondo, Y., Kato, T. & Nagatsu, T. (1976): Retrograde axoplasmic transport of inactive dopamine- β -hydroxylase in sciatic nerves. *Brain Res.* 116:277-285
- Neale, J.H., Elam, J.S., Neale, E.A. & Agranoff, B.W. (1974): Axonal transport and turnover of proline and leucine-labeled protein in the goldfish visual system. *J.Neurochem.* 23:1045-1055
- Netter, H. (1959): Theoretische Biochemie. Physikalisch-chemische Grundlagen der Lebensvorgänge. Springer, Berlin
- Nicholson, C. & Hounsgaard, J. (1983): Diffusion in the slice microenvironment and implications for physiological studies. *Fed.Proc.* 42:2865-2868
- Nicholson, G.L. (1974): The interactions of lectins with animal cell surfaces. *Int.Rev.Cytol.* 39:89-190
- O'Farrell, P.H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.* 250:4007-4021
- Ochs, S. (1971): Local supply of energy to the fast axoplasmic transport mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 68:1279-1282
- Ochs, S. (1972): Rate of fast axoplasmic transport in mammalian nerve fibers. *J.Physiol.(Lond.)* 227:627-645
- Ochs, S. (1975): Retention and redistribution of proteins in mammalian nerve fibers by axoplasmic transport. *J.Physiol.* 253:459-475
- Ochs, S. (1982): Axoplasmic Transport and its Relation to Other Nerve Functions. J.Wiley & Sons, New York
- Ohlson, C., Nilsson, E. & Karlsson, J.O. (1985): Uptake and anterograde axonal transport of Aleuria lectin in retinal ganglion cells of the rabbit. *J.Neurochem.* 44:1785-1790
- Penningroth, S.M., Cheung, A., Bouchard, P., Gagnon, C. & Bardin, C.W. (1982): Dynein ATPase is inhibited selectively in vitro by erythro-[3-2-(hydroxynonyl)]adenine. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 104:234-240
- Porter, K.R., Byers, H.R. & Ellisman, M.H. (1979): The cytoskeleton. In: The Neurosciences, 4th Study Program (Schmitt, F.O. & Worde, F.G. eds.), MIT Press, Cambridge, pp. 703-722

- Price, C.H., McAdoo, D.J., Farr, W. & Okuda, R. (1979): Bidirectional transport of free glycine in identified neurons R3-R14 of *Aplysia*. *J.Neurobiol.* 10:551-571
- Rambourg, A. & Droz, B. (1980): Smooth endoplasmic reticulum and axonal transport. *J.Neurochem.* 35:16-25
- Rebhun, L.I. (1972): Polarized intracellular particle transport: saltatory movements and cytoplasmic streaming. *Int.Rev.Cytol.* 32:93-137
- Röderer, G. (1984a): Toxic effects in plant organisms. In: *Biological Effects of Organolead Compounds* (Grandjean, P. ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 63-95
- Röderer, G. (1984b): On the toxic effects of tetraethyl lead and its derivatives on the Chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis*. V. Electron microscopic studies. *Env.Exp.Bot.* 24:17-30
- Röderer, G. (1985): Benzinblei-Problematik: Zum Wirkungsmechanismus von Triäthylblei. *BIUZ* 15:129-133
- Röderer, G. & Doenges, K.H. (1983): Influence of trimethyl lead and inorganic lead on the in vitro assembly of microtubules from mammalian brain. *Neurotoxicology* 4:171-180
- Roßberger, S. (1981): Untersuchungen zur Proteinsynthese in den verschiedenen Schichten des Hippocampus unter Verwendung einer neu entwickelten Mikroinjektionsapparatur. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Rotman, B. & Papermaster, B.W. (1966): Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 55:134-141
- Sawchenko, P.E. & Gerfen, C.R. (1985): Plant lectins and bacterial toxins as tools for tracing neuronal connections. *TINS* 8:378-384
- Schliwa, M. (1984): Mechanisms of intracellular organelle transport. In: *Cell and Muscle Motility* (Shay, J.W. ed) Vol.5:1-82
- Schliwa, M., Ezzell, R.M. & Euteneuer, U. (1984): Erythro-9-[3-(2-hydroxynonyl)]adenine is an effective inhibitor of cell motility and actin assembly. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 81:6044-6048
- Schmid, G., Wagner, L. & Weiss, D.G. (1983): Rapid axoplasmic transport of free leucine. *J.Neurobiol.* 14:133-144
- Schmid, H., Taylor, D.C.M. & Pierau, F.K. (1983): Tracing of sensory neurones and spinal motoneurones of the pigeon by injection of fluorescent dyes into peripheral nerves. *Cell Tiss.Res.* 232:9-19
- Schmitt, F.O. (1968): Fibrous proteins - neuronal organelles. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 60:106-117

- Schnapp, B.J., Vale, R.D., Sheetz, M.P. & Reese, T.S. (1985): Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles. *Cell* 40:455-462
- Schwab, M.E. & Thoenen, H. (1976): Electron microscopic evidence for a transsynaptic migration of tetanus toxin in spinal cord motoneurons: An autoradiographic and morphometric study. *Brain Res.* 105:213-227
- Schwab, M.E. & Thoenen, H. (1983): Mechanism of uptake and retrograde axonal transport of noradrenaline in sympathetic neurons in culture: Reserpine-resistant large dense-core vesicles as transport vehicles. *J.Cell Biol.* 96:1538-1547
- Schwab, M.E., Javoy-Agid, F. & Agid, Y. (1978): Labeled wheat germ agglutinin (WGA) as a new, highly sensitive retrograde tracer in the rat brain hippocampal system. *Brain Res.* 152:145-150
- Schwartz, J.H., Goldman, J.E., Ambron, R.T. & Goldberg, D.J. (1976): Axonal transport of vesicles carrying ^3H -serotonin in the meta-cerebral neuron of *Aplysia californica*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 40:83-92
- Seitz-Tutter, D. (1985): Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Riechnerven des Hechts (*Esox lucius* L.) unter Verwendung der Meerrettichperoxidase (HRP)-Technik. Diplomarbeit Ludwig-Maximilians-Universität München
- Siegel, S. (1985): Nichtparametrische Statistische Methoden. Fachbuchhandlung für Psychologie (Verlagsabteilung), Eschborn
- Sjöstrand, J. (1982): Role of axonal transport in the pathophysiology of retinal and optic nerve disease. In: *Axoplasmic Transport in Physiology and Pathology* (Weiss, D.G. & Gorio, A. eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 146-152
- Skene, J.H.P. & Willard, M. (1981): Electrophoretic analysis of axonally transported proteins in toad retinal ganglion cells. *J.Neurochem.* 37:79-87
- Smith, R.S. (1980): The short term accumulation of axonally transported organelles in the region of localized lesions of single myelinated axons. *J.Neurocytol.* 9:39-65
- Smith, R.S. (1982): Axonal transport of optically detectable particulate organelles. In: *Axoplasmic Transport* (Weiss, D.G. ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 181-192
- Smith, R.S. (1986): Control of direction of axonal transport in the vertebrates. In: *Axonal Transport* (Smith, R.S. ed.), Alan Liss, New York, in press
- Snyder, R.E. & Smith, R.S. (1984): Physical methods for the study of the dynamics of axonal transport. *CRC Crit.Rev.Biomed.Eng.* 10:89-123

- Stämpfli, R. (1946): Untersuchungen an der einzelnen, lebenden Nerven-faser des Frosches. I. Die Präparation der einzelnen Nervenfasern. *Helv. Physiol. Acta* 4:411-415
- Steward, O. (1981): Horseradish peroxidase and fluorescent substances and their combination with other techniques. In: *Neuroanatomical Tract-Tracing Methods* (Heimer, L. & Robards, M.J. eds.), Plenum Press, New York, London, pp. 279-310
- Storm, R. (1965): *Wahrscheinlichkeitsrechnung, mathematische Statistik und statistische Qualitätskontrolle*. VEB Fachbuchhandlung, Leipzig
- Szaro, B.G., Faulkner, L.A., Hunt, R.K. & Loh, Y.P. (1984): Axonal transport of ³⁵S-Methionine labeled proteins in *Xenopus* optic nerve: Phases of transport and the effects of nerve crush on protein patterns. *Brain Res.* 297:337-355
- Takenaka, T., Gotoh, H. & Horie, H. (1985): Particle movements and microtubules in axoplasmic transport. In: *Perspectives on Neuroscience. From Molecule to Mind* (Tsukada, Y. ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 81-90
- Taylor, D.C.M., Pierau, F.K. & Schmid, H. (1983): The use of fluorescent tracers in the peripheral sensory nervous system. *J. Neurosci. Meth.* 8:211-224
- Time/Data Monograph Series Monograph Two III. Fourier Series and Integrals. (1966) (ohne Autor) Time Data Corporation
- Tomlinson, A.H. & Esiri, M.M. (1983): Herpes simplex encephalitis. Immunohistological demonstration of spread of virus via olfactory pathways in mice. *J. Neurol. Sci.* 60:473-484
- Tomlinson, D.R. & Mayer, J.H. (1984): Defects of axonal transport in diabetes mellitus - a possible contribution to the aetiology of diabetic neuropathy. *J. Auton. Pharmac.* 4:59-72
- Tsukita, S. & Ishikawa, H. (1980): The movement of membranous organelles in axons. Electron microscopic identification of anterogradely and retrogradely transported organelles. *J. Cell Biol.* 84:513-530
- Turner, P.T. & Harris, A.B. (1974): Ultrastructure of exogenous peroxidase in cerebral cortex. *Brain Res.* 74:305-326
- Tytell, M., Black, M.M., Garner, J.A. & Lasek, R.J. (1981): Axonal transport: Each major rate component reflects the movements of distinct macromolecular complexes. *Science* 214:179-181
- Vale, R.D., Schnapp, B.J., Reese, T.S. & Sheetz, M.P. (1985a): Movement of organelles along filaments dissociated from the axoplasm of the squid giant axon. *Cell* 40:449-454

- Vale, R.D., Schnapp, B.J., Reese, T.S. & Sheetz, M.P. (1985b): Organelle, bead, and microtubule translocations prompted by soluble factors from the squid giant axon. *Cell* 40:559-569
- Vale, R.D., Reese, T.S. & Sheetz, M.P. (1985c): Identification of a novel, force-generating protein, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42:39-50
- Vale, R.D., Schnapp, B.J., Mitchison, T., Steuer, E., Reese, T.S. & Sheetz, M.P. (1985d): Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell* 43(12,pt2): 623-632
- Wade, M.H., Trosko, J.E. & Schindler, M. (1986): A fluorescence photo-bleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells. *Science* 232:525-528
- Walter, R.J. & Berns, M.W. (1981): Computer-enhanced video microscopy: Digitally processed microscope images can be produced in real time. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78:6927-6931
- Weerasuriya, A., Rapoport, S.I. & Taylor, R.E. (1980): Ionic permeabilities of the frog perineurium. *Brain Res.* 194:405-412
- Weiss, D.G. (ed)(1982a): *Axoplasmic Transport*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Weiss, D.G. (1982b): General properties of axoplasmic transport. In: *Axoplasmic Transport in Physiology and Pathology* (Weiss, D.G. & Gorio, A. eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 1-14
- Weiss, D.G. (1982c): 3-O-methyl-D-glucose and β -alanine: Rapid axoplasmic transport of metabolically inert low molecular weight substances. *Neurosci.Lett.* 31:241-246
- Weiss, D.G. (1986): The mechanism of axoplasmic transport. In: *Axoplasmic Transport* (Iqbal, Z. ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 275-307
- Weiss, D.G. & Gorio, A. (eds.)(1982): *Axoplasmic Transport in Physiology and Pathology*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Weiss, D.G. & Gross, G.W. (1982): The microstream hypothesis of axoplasmic transport: Characteristics, predictions, and compatibility with data. In: *Axoplasmic Transport* (Weiss, D.G. ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 362-383
- Weiss, D.G. & Gross, G.W. (1983): Intracellular transport in axonal microtubular domains. I. Theoretical considerations on the essential properties of a force generating mechanism. *Protoplasma* 114:179-197
- Weiss, D.G. & Allen, R.D. (1985): The organization of force generation in microtubule-based motility. *Microtubules and Microtubule Inhibitors 1985* (DeBrabander, M. & DeMey, J. eds.), Elsevier, North Holland, Amsterdam, pp. 233-240

- Weiss, D.G., Krygier-Brevart, V., Gross, G.W. & Kreutzberg, G.W. (1978): Rapid axoplasmic transport in the olfactory nerve of the pike:II. Analysis of transported proteins by SDS gel electrophoresis. *Brain Res.* 139:77-87
- Weiss, D.G., Schmid, G. & Wagner, L. (1980): Influence of microtubule inhibitors on axoplasmic transport of free amino acids. Implications for the hypothetical transport mechanism. In: *Microtubules and Microtubule Inhibitors 1980* (DeBrabander, M. ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 31-41
- Weiss, D.G., Keller, F., Gulden, J. & Maile, W. (1986a): Towards a new classification of intracellular particle movements based on quantitative analyses. *Cell Motil.Cytoskel.* 6:128-135
- Weiss, D.G., Seitz-Tutter, D., Langford, G.M. & Allen, R.D. (1986b): The native microtubule as the engine for bidirectional organelle movements. In: *Axonal Transport* (Smith, R.S. ed.), Alan Liss, New York, in press
- Williams, L.R. & Agranoff, B.W. (1983): Retrograde transport of goldfish optic nerve proteins labeled by N-succinimidyl(³H)propionate. *Brain Res.* 259:207-216
- Wojcieszyn, J.W., Schlegel, R.A. & Jacobson, K.A. (1982): Measurements of the diffusion of macromolecules injected into the cytoplasm of living cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol.* 46:39-44
- Woodward, W.R. (1984): Axonal transport of ³H-GABA and ³H-glutamate in excitatory and inhibitory neurons innervating lobster exoskeletal musculature. *J.Neurobiol.* 15:49-65
- Young, M.R. & Hart, P.D'Arcy (1986): Movements and other distinguishing features of small vesicles identified by darkfield microscopy in macrophages. *Exp.Cell Res.* 164:199-210
- Zimmermann, H.P., Doenges, K.H. & Röderer, G. (1985): Interaction of triethyl lead with microtubules in vitro and in mammalian cells. *Exp.Cell Res.* 156:140-152

Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. Dieter G. Weiss danke ich für die Überlassung des Themas und die praktische und theoretische Betreuung der Arbeit.

Herrn Josef Gulden danke ich für die Einweisung in die Methoden der Video-Mikroskopie.

Herrn Franz Keller danke ich für die Einweisung in die Benützung seines Programms zur Feinanalyse der Organellenbewegung.

Herrn Willibald Maile danke ich für wertvolle Hinweise zu den Fotoarbeiten und Hilfeleistungen bei der Auswertung eines Teils der Organellenbewegung.

Herrn Dieter Seitz-Tutter danke ich für die freundliche Überlassung der EM-Aufnahme.

Herrn Dr. G. Röderer danke ich für die Überlassung von Tri-Ethylblei.

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (We 790/7-5) finanziell unterstützt und durch ein Stipendium nach dem Bayerischen Graduiertenförderungsgesetz gefördert.

Lebenslauf

Name	Klaus Buchner
geboren am	17. März 1956
Geburtsort	Auberg/Raitenhaslach (Kreis Altötting, Bayern)
1962 - 1966	Volksschule in Altötting
1966 - 1974	Mat.-nat. Zweig des Ruperti-Gymnasiums in Mühldorf/Inn
Juni 1974	Abitur
1974 - 1975	Wehrdienst
ab Wintersemester 1975/76	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
4.10.1977	Diplom-Vorprüfung in Biologie
ab Sommersemester 1978	Weiterführung des Biologiestudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München in Biochemie, Botanik und <u>Zoologie</u>
1982	nach Tätigkeit als studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. D.G.Weiss (Zoolog. Institut) Beginn der Diplomarbeit in diesem Labor.
27.4.1983	Abschluß der Diplomhauptprüfung Biologie
seit Mai 1983	Arbeit an der Dissertation (Thema: Vergleich von anterogradem und retrogradem axonalen Transport im Riechnerv des Hechtes.)

